



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Συγκριτική μελέτη μικροβιακού φορτίου τυριών αγελαδινής προέλευσης

Τσαλή Ελευθερία

Κτηνίατρος, DVM, PhD



Λάρισα, 2018

Συγκριτική μελέτη μικροβιακού φορτίου τυριών αγελαδινής προέλευσης.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαμούρης Ζήσης	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Μούτου Αικατερίνη	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Σαραφίδου Θεολογία	Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πριν ξεκινήσω την παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας με την οποία ασχολήθηκα στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Τοξικολογία, θα ήθελα να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους για την αμέριστη βοήθειά που μου προσέφεραν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη. Πρωτίστως να τον ευχαριστήσω, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου την εκτέλεση αυτής της εργασίας, αλλά επίσης και για την επιστημονική υποστήριξη ώστε να ολοκληρωθεί αυτή η εργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα, τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο, για την πολύτιμη βοήθειά του, το ενδιαφέρον, την προθυμία και τον χρόνο που αφιέρωσε κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού μέρους της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο Διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο για τη συνεργασία, την ανταλλαγή απόψεων και την καθοδήγηση του σε όλα τα στάδια υλοποίησης της παρούσας εργασίας, καθώς και την πολύτιμη βοήθεια του κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της εργασίας και της παρουσίας τους. Επίσης, ευχαριστώ όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε στο εργαστήριο.

Ακόμη, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Αικατερίνη Μούτου και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Θεολογία Σαραφίδου, για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους, για το ενδιαφέρον τους καθώς και για τη συμβολή τους στην τελική μορφή του κειμένου.

Τέλος, πολλές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένεια μου, που υπήρξαν το στήριγμά μου, για την αμέριστη ηθική στήριξη που μου παρείχαν, για την κατανόηση που επέδειξαν κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τσαλή Ελευθερία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT.....	7
1. Εισαγωγή.....	8
1.1. Η ιστορία του τυριού στον κόσμο και την Ελλάδα.....	8
1.2 Τυρί: τρόπος παρασκευής και παραγωγή.....	9
1.3 Κατηγορίες τυριών-Π.Ο.Π. τυριά.....	11
1.4 Μεταβολές των τυριών κατά την ωρίμανση.....	13
1.4.1 Μικροοργανισμοί.....	13
1.4.2 Η γλυκόλυση στην τυροκόμηση.....	16
1.4.3 Η πρωτεόλυση στην τυροκόμηση.....	17
1.4.4 Η λιπόλυση στην τυροκόμηση.....	19
2. Πληθυσμοί μικροοργανισμών σε διάφορα τυριά	20
2.1 Οι ζύμες	20
2.2 Οι μικρόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι.....	21
2.3 Τα προπιονικά βακτήρια.....	23
2.4 Τα γαλακτικά βακτήρια	24
2.4.1 Γενικά για τα γαλακτικά βακτήρια	24
2.4.2 Γαλακτικά βακτήρια ελληνικών παραδοσιακών τυριών.....	27
3. Μέθοδοι ταυτοποίησης, αρίθμησης και χαρακτηρισμού των βακτηρίων στα τρόφιμα.....	29
3.1 Μέθοδοι που εξαρτώνται από καλλιέργειες.....	30
3.1.1 Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των βακτηρίων.....	31
3.2 Μέθοδοι που δεν εξαρτώνται από καλλιέργειες	32
3.2.1 Άμεση ταυτοποίηση βακτηρίων	33
3.2.2 Εκτίμηση αποτυπώματος πολύπλοκων βακτηριακών κοινοτήτων	34
3.3 In situ μέθοδοι.....	35
3.4 Αλληλούχιση του 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA)	35
4. Σκοπός της εργασίας.....	37
5. Πειραματική πορεία-Μέθοδοι.....	37
5.1 Δείγματα.....	37
5.2 Απομόνωση DNA	37
5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και φωτομέτρηση.....	38
5.4 PCR και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA.....	40
5.4.1 Ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA Multiplex PCR.....	40

5.4.2 Δημιουργία βιβλιοθηκών και αλληλούχιση.....	41
5.4.3 Ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	41
6. Αποτελέσματα	42
6.1 Απομόνωση DNA.....	42
6.2 Αποτελέσματα φωτομέτρησης δειγμάτων.....	43
6.3 Αποτελέσματα PCR και αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA.....	43
6.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA και ταυτοποίησης των βακτηρίων ανά οικογένειας, γένος και είδος.....	45
6.4.1 Αποτελέσματα του δείγματος λευκού τυριού.....	48
6.4.2 Αποτελέσματα του δείγματος κασεριού	49
6.4.3 Αποτελέσματα του δείγματος γραβιέρας.....	51
6.4.4 Αποτελέσματα του δείγματος ημίσκληρου τυριού.....	52
6.4.4 Αποτελέσματα του δείγματος σκληρού τυριού	53
6.4.6 Συγκριτικά αποτελέσματα των δειγμάτων	54
7. Συζήτηση.....	57
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πολυπλοκότητα της μικροβιακής χλωρίδας των γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως και η μελέτη και κατανόηση της δυναμικής μεταξύ των βακτηρίων, έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης αρκετών μικροβιολογικών ερευνών. Οι μικροβιολογικές τεχνικές που βασίζονται στην απομόνωση και καλλιέργεια των βακτηρίων, έχουν δείξει ότι υπάρχουν αυστηρά όρια στην κατανόηση της ποικιλότητας του οικοσυστήματος των βακτηρίων. Έτσι, προσεγγίσεις που στηρίζονται στην ανάλυση του γενετικού υλικού των βακτηρίων έχει προταθεί ως επιλογή σε συνδυασμό με καινούριες μοριακές τεχνικές.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή μελετήσαμε την μικροβιακή χλωρίδα πέντε τυριών, τα οποία παρασκευάστηκαν από αγελαδινό γάλα. Για την μελέτη του βακτηριακού πληθυσμού των τυριών χρησιμοποιήσαμε το Ion 16S™ Metagenomics Kit το οποίο με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ενίσχυσε το 16S ριβοσωμικό RNA των βακτηρίων. Η μέθοδος αυτή, είναι μια γρήγορη τεχνική και στηρίζεται στην ποικιλία του 16S rRNA γονιδίου. Στη συνέχεια με την Ion Torrent πλατφόρμα πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των ειδών των βακτηρίων με την αλληλούχιση του 16S rRNA, εκτίμηση της ποικιλότητας των βακτηρίων και ομαδοποίησή τους σύμφωνα με τα κοινά χαρακτηριστικά αλληλούχιση τους ώστε να πραγματοποιηθεί ταξινόμηση τους σε οικογένειες, γένη και είδη βακτηρίων.

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 63080 αλληλουχίες για το δείγμα του λευκού τυριού, 59235 αλληλουχίες για το δείγμα του κασεριού, 44232 αλληλουχίες για το δείγμα της γραβιέρας, 42638 αλληλουχίες για το δείγμα του ημίσκληρου τυριού και 53860 αλληλουχίες για το δείγμα του σκληρού τυριού, προκειμένου να γίνει ταξινομική ανάλυση. Σε όλα τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν 51 διαφορετικά είδη βακτηρίων, από τα οποία ορισμένα περιέχονται στις αρχικές καλλιέργειες της τυροκόμησης, κάποια υπάρχουν στο περιβάλλον που διαβιών τα βοοειδή, ενώ κάποια άλλα είναι υπεύθυνα για την πρόκληση νοσημάτων στα βοοειδή. Στο δείγμα του κασεριού ταυτοποιήθηκαν οι περισσότερες οικογένειες, γένη και είδη βακτηρίων σε σύγκριση με τα υπόλοιπα δείγματα τυριών που μελετήθηκαν.

Συμπερασματικά με τη μέθοδο αλυσιδωτή αντίδρασης της πολυμεράσης και αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA μπορέσαμε να ταυτοποιήσουμε τα είδη των βακτηρίων που υπάρχουν στα δείγματα τυριών που εξετάσαμε, ακόμα και όταν αυτά υπάρχουν σε πολύ μικρό ποσοστό, και σε περιπτώσεις που δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθούν τα είδη των βακτηρίων, ταυτοποιήθηκαν οι οικογένειες και τα γένη των βακτηρίων.

ABSTRACT

The complexity of food microbial ecosystems and the importance of investigating and understanding the microbial dynamics in dairy products are well-known concepts in the field of microbial research. Traditional microbiology based on the isolation and cultivation of microorganisms has shown strong limits in the understanding of ecosystem biodiversity. Thus, culture-independent approaches based on direct microbial nucleic acid analysis have been optimized, together with new molecular techniques.

In this Dissertation, we have studied the bacterial population of five cheeses which were made by cow milk. This study used Ion 16S™ Metagenomics Kit with 16S rRNA cloning and sequencing to characterize the bacterial communities. Research using 16S ribosomal RNA (rRNA) sequencing is a fast profiling technique based on variation in the bacterial 16S rRNA gene. Next by using Ion Torrent Software results in 16S rRNA sequencing, was made bacterial populations' characterization, taxonomical analysis, and species identification.

A total of 63080 clones for white cheese sample, 59235 clones for kasseri sample, 44232 clones for graviera sample, 42638 clones for semihard cheese sample and 53860 clones for hard cheese sample, were used for taxonomic analysis. 51 bacterial species were identified to all samples from which, some were included to starter cultures occurring during the manufacture of cheese, few exist to the cow's environment while others are responsible for cow diseases. From kasseri sample were identified the most families, genus and bacterial species, in comparison with the other cheese samples we studied.

In conclusion, using the 16S rRNA gene sequence and profiling, we managed to identify the bacterial species of the samples of our study, even in low numbers, and in case this was not possible, we identified the families and genus of bacteria.

1. Εισαγωγή

1.1. Η ιστορία του τυριού στον κόσμο και την Ελλάδα .

Η τεχνολογία της κατεργασίας του γάλακτος διαδόθηκε στην Ευρώπη από τις χώρες της Ανατολής που είχαν γνώσεις στο αντικείμενο. Στους αρχαίους Έλληνες το τυρί ήταν γνωστό από την εποχή του Ομήρου. Οι πιο πρόσφατες πηγές της προέλευσης του τυριού ή της τυροκομίας, αναφέρονται σε σανσκριτικά γραπτά των Σουμέριων το 4000 π.Χ., σε αναφορές των Βαβυλώνιων το 2000 π.Χ. και σε ύμνους από τη βέδα, το ιερό βιβλίο των Ινδουιστών. Η παρασκευή του τυριού, έχει τις ρίζες της πολλούς αιώνες πριν, όταν νομαδικές φυλές των χωρών της ανατολικής Μεσογείου μετέφεραν το γάλα οικόσιτων θηλαστικών σε σακίδια από δέρμα ζώων, ή σε στομάχια ζώων. Όταν κάποια στιγμή οι νομάδες δεν φρόντισαν να διατηρήσουν το γάλα δροσερό, τότε αυτό ξίνισε και διαχωρίστηκε σε πηγμα και ορό (Robinson, 1990).

Οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι, αναγνώρισαν από νωρίς τη διατροφική αξία του τυριού. Η διαδικασία τυροκόμησης που περιγράφεται στο Columella (De Re Rustica) τον 1ο αιώνα μ.Χ., δείχνει ότι υπήρξε μια σταδιακή εξέλιξη από την όξινη πήξη του γάλακτος με φυσική ζύμωση, στην ελεγχόμενη παραγωγή τυροπήγματος, το οποίο μπορούσε να διατηρηθεί επί μακρόν (Robinson, 1990).

Αναφορές για την ανάπτυξη της τυροκομίας στην Ελλάδα υπάρχουν από αρχαιοτάτων χρόνων. Σύμφωνα με την ελληνική μυθολογία, η τέχνη της τυροκομίας δόθηκε ως πολύτιμο δώρο στους θνητούς από τους θεούς του Ολύμπου. Ο Διόδωρος (Διόδωρος ο Σικελός, IV 81.1 και 81.2; 1ος αιώνας π.Χ.), ο Έλληνας ιστορικός από τη Σικελία, που έμαθε την τέχνη της τυροκομίας από τις βρεφοκόμους του, τις νύμφες, περιγράφει στον Αρίσταιο, γιο του Απόλλωνα και εγγονό του Δία, την εφεύρεση του τυριού.

Οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν το γάλα ιερή τροφή γιατί ο Δίας, κυνηγημένος από τον πατέρα του Κρόνο, κρύφτηκε με τη βοήθεια της μητέρας του Ρέας και τράφηκε με το γάλα της ιερής κατσίκας Αμάλθειας. Επιπλέον, ο Δίας προκειμένου να θρέψει το γιο του Ηρακλή με θεϊκό γάλα ώστε να γίνει αθάνατος, προκάλεσε κατάκλιση του ουρανού από γάλα και έτσι ο ουρανός γέμισε με γαλαξίες (milky way; Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2007).

Ο Όμηρος τον 8ο αιώνα π.Χ. στην Οδύσσεια (IX, στίχοι 218-223, 244-249), περιγράφει καλά τον βοσκό και τυροκόμο Πολύφημο. Ο Αριστοτέλης (384-322 π.Χ.) κάνει λόγο για το «Φρύγιο» τυρί, το οποίο παρασκευαζόταν από γάλα γαϊδούρας και φοράδας, και γνώριζε ότι το γάλα περιείχε λίπος, καζεΐνες και νερό. Ο Αριστοφάνης, ο Ησύχιος, ο Αριστοτέλης κ.ά., κάνουν αναφορά σε επαγγέλματα που είχαν σχέση με την προβατοτροφία, όπως «προβατοπώλαι», «γαλακτοκόμοι», «γαλακτουργοί», «τυροποιοί», «τυρευτύρες». Η αγορά των

Αθηνών είχε ειδικό χώρο για τα τυριά, ενώ οι νέοι της Σπάρτης προέβαιναν σε κλοπή τυριών στο πλαίσιο τελετουργικής εορτής, ως ένδειξη ανδρείας. Ο Αριστοτέλης και ο Διοσκουρίδης περιέγραφαν την ανάμιξη γίδινου γάλακτος με φύλλα, ενώ άλλοι την ανάμιξη γάλακτος με ξύδι ή λεμόνι για τη δημιουργία τυριού (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, 2007).

Στην υπόλοιπη Ευρώπη η παρασκευή του τυριού διαδόθηκε από τις στρατιές της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας. Κατά το Μεσαίωνα η τυροκομία βελτιώθηκε από τους μοναχούς των διαφόρων ευρωπαϊκών μοναστηριών. Έτσι, μέχρι τον 19ο αιώνα, η τυροκόμηση του γάλακτος γινόταν με εμπειρικές τεχνικές και στη συνέχεια εφαρμόστηκαν επιστημονικές μέθοδοι με αποτέλεσμα η τυροκομία να αναπτυχθεί σημαντικά και να στηρίζει σήμερα την οικονομία πολλών ανεπτυγμένων χωρών (Γιαννούλη, 2005). Ο Παλλάδιος ο οποίος έγραψε μια πραγματεία στο *Agriculture in Britain* 300 χρόνια μετά την κατάκτηση της Βρετανίας από τους Ρωμαίους, υποστηρίζει ότι η τυροκόμηση πρέπει να γίνεται νωρίς το καλοκαίρι, ότι το γάλα πρέπει να πήζει με πυτιά από στομάχι κατσικιού, αρνιού ή μοσχαριού, ή εναλλακτικά, από γάλα συκιάς (Robinson, 1990).

Σήμερα, μετά από 8000 χρόνια από τα ομηρικά χρόνια, υπάρχουν πάνω από 1000 ποικιλίες τυριών παγκοσμίως (Sandine and Elliker, 1970), η κάθε μία μοναδική σε ότι αφορά τα γενικά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (flavor), τη μορφή και το σχήμα (Beresford et al., 2001).

1.2 Τυρί: τρόπος παρασκευής και παραγωγή

Στη χώρα μας υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία παραδοσιακών τυριών από κατσικίσιο, αγελαδινό ή πρόβειο γάλα. Σύμφωνα με το άρθρο 83 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, τα τυριά είναι προϊόντα ωρίμανσης του πηγματος (στάλπης) που είναι απαλλαγμένο από το τυρόγαλα στον επιθυμητό κάθε φορά βαθμό και τα οποία παρασκευάστηκαν με την προσθήκη πυτιάς ή άλλων ενζύμων που δρουν ανάλογα σε νωπό ή παστεριωμένο γάλα αγελάδας, προβάτου, κατσίκας, βουβάλου ή και μιγμάτων αυτών. Επίσης, από προσθήκη πυτιάς σε μερικώς αποβουτυρωμένο γάλα ή σε μίγμα του γάλακτος ή και σε μίγματα αυτών με κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα).

Ο παραπάνω ορισμός αναφέρεται στα τυριά από γάλα με ωρίμανση. Όμως εκτός από τα παραπάνω τυριά υπάρχουν και τα τυριά από γάλα χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή και τυριά τυρογάλακτος με ή χωρίς ωρίμανση.

Στην πράξη, το τυρί προέρχεται από την ολική ή μερική πήξη του γάλακτος με την επένεργεια της πυτιάς ή άλλων κατάλληλων πηκτικών μέσων (οξίνιση, θέρμανση) και αφού γίνει μερική στράγγιση του ορού του γάλακτος που προκύπτει μετά από μια τέτοια πήξη.

Στην παρασκευή του τυριού εκτός από τις παραδοσιακές τεχνικές πήξης του γάλακτος (πυτιά, θερμοκρασία, οξίνιση) μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε και πιο εξελιγμένες τεχνικές επεξεργασίας που περιλαμβάνουν πήξη του γάλακτος ή/και προϊόντων που λαμβάνονται από γάλα και δίνουν ένα τελικό προϊόν παρόμοιο με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτό το οποίο έχει προκύψει με τις παραδοσιακές τεχνικές (Fox et al., 1999).

Βασικές πρώτες ύλες για την παραγωγή τυριών είναι: το γάλα, τα πηκτικά ένζυμα (πυτιά και υποκατάστατα αυτής), οξυγαλακτική καλλιέργεια, αλάτι, πρόσθετες ύλες (χρωστικές, προσθετικά, συντηρητικά).

Η περίοδος της δημιουργίας του πρώτου πήγματος ορίζεται ως η χρονική διάρκεια των 24 πρώτων ωρών κατά τις οποίες διενεργούνται συγκεκριμένες εργασίες όπως το αλάτισμα, η αφυδάτωση κ.α. που αποτελούν τα βασικά βήματα μιας τυροκόμησης, ανεξάρτητα από τον τύπο τυριού που θέλουμε να παρασκευάσουμε. Επομένως, σε αυτές τις εργασίες συνήθως εντάσσονται: η οξίνιση, η δημιουργία πήγματος, η αφυδάτωση αυτού (αυτή επιτυγχάνεται με τον τεμαχισμό του πήγματος σε κύβους, την πίεση αυτού, την ανάπλαση αυτού, τη θέρμανσή του, το αλάτισμα αυτού καθώς και άλλους τρόπους που διευκολύνουν τη συναίρεση του πήγματος), τη σχηματοποίηση του τυριού (με πίεση ή σε εκμαγείο) και τέλος το αλάτισμα του τελικού πήγματος (Fox et al., 1999).

Με άλλα λόγια, η δημιουργία του πρώτου πήγματος του τυριού είναι μια διαδικασία αφυδάτωσης κατά την οποία το λίπος και η καζεΐνη συμπυκνώνονται από 6 ως 12 φορές, ανάλογα με το είδος του τυριού. Η δημιουργία αυτού του πρώτου πήγματος συμβαίνει μετά την διάσπαση της κ-καζεΐνης από τα πρωτεολυτικά ένζυμα της πυτιάς, κυρίως τη χυμοσίνη ή την πεψίνη ή άλλες μικροβιακής φύσεως πρωτεϊνάσες (Fox et al., 1999).

Η παρασκευή των περισσότερων ποικιλιών τυριών εμπλέκει το συνδυασμό τεσσάρων βασικών συστατικών, που είναι το γάλα, η πυτιά, οι μικροοργανισμοί και το αλάτι, τα οποία χρησιμοποιούνται σε πολλά στάδια, όπως ο σχηματισμός πήγματος, η αποβολή του ορού, η παραγωγή οξέος, η προσθήκη αλατιού και η μακρά (συνήθως) περίοδος ωρίμανσης. Και ενώ οι διάφορες παραλλαγές στη θερμοκρασία ή το κόψιμο του τυροπήγματος παίζουν σημαντικό ρόλο στα χαρακτηριστικά του κάθε τυριού, η μικροχλωρίδα του τυριού είναι ζωτικής σημασίας στην ανάπτυξη των μοναδικών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών κάθε ποικιλίας τυριού (Beresford et al., 2001).

Μια από τις σημαντικότερες φάσεις στην παραγωγή τυριών είναι η διαδικασία ωρίμανσης. Μόνο μια κατάλληλα διευθετημένη διαδικασία ωρίμανσης, που είναι συγκεκριμένη για κάθε τύπο τυριού, εξασφαλίζει την παραγωγή ενός προϊόντος υψηλής ποιότητας (Fox, 1993). Κατά

τη διάρκεια της ωρίμανσης, αναπτύσσονται μικροοργανισμοί στην επιφάνεια των τυριών. Αρκετά συχνά, αυτό το φαινόμενο είναι ανεπιθύμητο και ο περιοδικός καθαρισμός ή η επικάλυψη του τυριού με το προστατευτικό επίστρωμα (συνήθως κερί), αποτρέπει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στην επιφάνεια. Αυτό συμβαίνει ιδιαίτερα στην περίπτωση των σκληρών και ημίσκληρων τυριών, που ωριμάζουν εσωτερικά με τη συμμετοχή ενδογενών και πηκτινολυτικών ενζύμων του γάλακτος καθώς και μικροβιακών ενζύμων, που είναι παρόντα σε όλη τη μάζα του τυριού (Fox, 1993).

1.3 Κατηγορίες τυριών- Π.Ο.Π. τυριά

Η κατηγοριοποίηση των τυριών είναι ένα αρκετά δύσκολο εγχείρημα, λόγω της ύπαρξης ενός μεγάλου αριθμού τυριών που έχουν κατασκευαστεί με διαφορετικές τεχνολογίες και από διαφορετικές πρώτες ύλες. Στο παρελθόν, πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να κατατάξουν τα περίπου 2000 είδη τυριών σε κάποιες κατηγορίες σύμφωνα με κάποια κοινά χαρακτηριστικά τους.

Από τις πρώτες προσπάθειες κατάταξης των τυριών είναι αυτή του Schulz, ο οποίος διαφοροποιήθηκε από τις μέχρι τότε προσπάθειες κατάταξης που ήταν σύμφωνες μόνο με τις τεχνολογίες παρασκευής των τυριών. Αυτός λοιπόν πρότεινε ένα διαφορετικό τρόπο διαχωρισμού των τυριών, σύμφωνα με το ποσοστό υγρασίας. Έτσι, έχουμε τις πέντε παρακάτω κατηγορίες: α) Ξηρά Τυριά (Dried, με ποσοστό υγρασίας <40%), β) Τυριά για τρίψιμο (Grated, με ποσοστό υγρασίας 40-49,9%), γ) Σκληρά τυριά (Hard, με ποσοστό υγρασίας 50-59,9%), δ) Μαλακά τυριά (Soft, με ποσοστό υγρασίας 60-69%) και ε) Φρέσκα τυριά (Fresh, με ποσοστό υγρασίας 70-82%). Η καθεμία από τις παραπάνω τέσσερις κατηγορίες (τυριά για τρίψιμο, σκληρά, μαλακά, φρέσκα) υποδιαιρούνται σε 2 υποκατηγορίες ανάλογα με το αν έχουν υποστεί κάποιες επεξεργασίες όπως συμπίεση, θερμική επεξεργασία. Ακόμη, οι παραπάνω 8 κατηγορίες διαιρούνται ακόμη περισσότερο σε 6 με βάση τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο σύνολο των στερεών συστατικών ελεύθερων από λίπος και χλωριούχο νάτριο. Έτσι έχουμε τις εξής κατηγορίες ανάλογα με το ρυθμό και επίπεδο οξύτητας των τυριών: α) >2,5%, β) 2,1-2,5%, γ) 1,6-2%, δ) 1,1-1,5%, ε) 0,6-1%, στ) <0,6%.

Επίσης, ο Davis στην προσπάθειά του να κατατάξει τα τυριά, προτείνει διάφορα κριτήρια διαχωρισμού τους. Ένα από τα βασικά κριτήριά του είναι το ποσοστό υγρασία σε συνδυασμό με τις ρεολογικές ιδιότητες και γενικά τη τεχνολογία παρασκευής αυτών. Έτσι έχουμε τις παρακάτω κατηγορίες:

1. Μαλακά τυριά (Quarg, Cottage, Cream): Καταναλίσκονται σε λίγες μέρες μετά την παρασκευή τους, αν δεν ωριμάσουν ή σε λίγες εβδομάδες αν υποστούν ωρίμανση. Κατακρατούν στη μάζα τους σημαντική ποσότητα τυρογάλακτος και η τελική υγρασία τους κυμαίνεται από 40% και πάνω.
2. Ημίσκληρα τυριά (Taleggio, Limburg, Romadur): Καταναλώνονται μέσα σε 2-3 μήνες από την παρασκευή τους. Η υγρασία τους κυμαίνεται συνήθως μεταξύ 36-40%.
3. Σκληρά τυριά (Cheddar, Cheshire, Cantal, Emmental): Είναι η πιο διαδεδομένη κατηγορία στην παγκόσμια παραγωγή τυριών. Η υγρασία τους κυμαίνεται μεταξύ 25-36%.
4. Πολύ σκληρά τυριά (Grana, Parmesan): Ωριμάζουν πολύ πιο αργά από όλες τις προηγούμενες κατηγορίες και διατηρούνται περισσότερο. Με την πάροδο του χρόνου δεν επηρεάζονται άμεσα, απλώς θα πρέπει να σημειωθεί ότι γίνονται πιο σκληρά, πιο ξηρά και με σκοτεινότερη απόχρωση. Το ποσοστό υγρασίας τους κυμαίνεται περίπου στο 25% και χαμηλότερα.

Στη χώρα μας υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία παραδοσιακών τυριών από κατσικίσιο, αγελαδινό ή πρόβειο γάλα. Βάσει της ελληνικής νομοθεσίας τα τυριά χωρίζονται σε κατηγορίες ανάλογα με την περιεχόμενη υγρασία στη μάζα τους. Έτσι, έχουμε (α) τα πολύ σκληρά τυριά των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 32%, (β) τα σκληρά τυριά με υγρασία 32-38%, (γ) τα ημίσκληρα τυριά με υγρασία 38-46% και (δ) τα μαλακά τυριά με υγρασία 46-58%. Επίσης, υπάρχουν τα τυριά από γάλα χωρίς ωρίμανση με αλοιφώδη υφή που χαρακτηρίζονται ως φρέσκα-νωπά τυριά και παρασκευάζονται με την προσθήκη οξυγαλακτικών καλλιεργειών βακτηρίων σε παστεριωμένο γάλα ή παστεριωμένο γάλα και παστεριωμένη κρέμα γάλακτος (αφρόγαλα) και των οποίων η υγρασία δεν υπερβαίνει το 75%, ενώ στα τυριά τυρογάλακτος, τα οποία λαμβάνονται μετά από ισχυρή θέρμανση τυρογάλακτος και διατίθενται νωπά ή κατόπιν ωρίμανσης, η υγρασία δεν υπερβαίνει το 70%.

Επιπλέον, ένα άλλο χαρακτηριστικό των τυριών είναι ο ορισμός «Τυρί με Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης» (ΠΟΠ) ή αλλιώς PDO (Protected Designation of Origin), και μπορεί να χαρακτηριστεί ως τέτοιο το τυρί που παράγεται σε μια συγκεκριμένη περιοχή μιας χώρας, από γάλα που παράγεται μόνο στην περιοχή αυτή και η ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο γεωγραφικό περιβάλλον που επηρεάζει την ποιότητα των τυριών. Η ιδέα αυτή έχει σαν στόχο να προστατεύει και να διατηρεί την παραγωγή των παραδοσιακών προϊόντων της κάθε περιοχής και χρονολογείται από το 1883, οπότε και έγινε η συνθήκη του Παρισιού που πρότεινε τον όρο Appellation d' Origine Controlee (AOC, Ονομασία Ελεγχόμενης Προέλευσης). Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα από τους Γάλλους (Bertozzi and Panari, 1993). Τα τυριά που έχουν χαρακτηριστεί στην Ελλάδα

ως τυριά ΠΟΠ, δηλαδή Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (απόφαση Α.Χ.Σ. 596/94, ΦΕΚ 624/95) παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Όνομα τυριού	Περιοχή	Τύπος γάλακτος
Ανεβατό	Νομός Γρεβενών και επαρχία Βοΐου Κοζάνης	Γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Γαλοτύρι	Ηπειρος και Θεσσαλία	Γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Φέτα	Μακεδονία, Θράκη, Ηπειρος, Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησος, Ν. Λέσβου και Θεσσαλία	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γιδίνου έως 30% κ.β.
Γραβιέρα Αγράφων	Περιοχή Αγράφων	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γιδίνου έως 30% κ.β.
Γραβιέρα Κρήτης	Κρήτη	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γιδίνου έως 20% κ.β.
Γραβιέρα Νάξου	Νάξος	Γάλα αγελαδινό ή μίγμα αυτού με πρόβειο και γίδινο έως 20% κ.β.
Καλαθάκι Λήμνου	Λήμνος	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γιδίνου έως 30% κ.β.
Κασέρι	Μακεδονία, Θεσσαλία, Ν. Λέσβου και Ξάνθης	Γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο έως 20% κ.β.
Κατίκι Δομοκού	Δομοκός	Γάλα γίδινο ή μίγμα αυτού με πρόβειο
Κεφαλογραβιέρα	Δυτική Μακεδονία, Ηπειρος, Αιτωλοακαρνανία και Ευρυτανία	Γάλα πρόβειο ή μίγμα πρόβειου και γιδίνου έως 10% κ.β.
Κοπανιστή	Κύκλαδες	Γάλα αγελαδινό, πρόβειο ή γίδινο
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	Μυτιλήνη	Γάλα πρόβειο ή μίγμα αυτού με γίδινο
Μανούρι	Θεσσαλία, Δυτική και Κεντρική Μακεδονία	Τυρόγαλα από πρόβειο ή γίδινο γάλα ή μίγμα αυτών και γάλα πρόβειο ή γίδινο ή κρέμα αυτού
Μετσοβόνο	Μέτσοβο	Γάλα αγελαδινό ή μίγμα αυτού με πρόβειο και γίδινο έως 20% κ.β.
Μπάτζος	Θεσσαλία, Δυτική και Κεντρική Μακεδονία	Γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Ξυνομυζήθρα Κρήτης	Κρήτη	Τυρόγαλα από γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Πηχτόγαλο Χανίων	Κρήτη	Γάλα γίδινο ή πρόβειο ή μίγμα αυτών
Σαν Μιχάλη	Σύρος	Γάλα αγελαδινό
Σφέλα	Ν. Μεσσηνίας και Λακωνίας	Γάλα πρόβειο ή γίδινο ή μίγμα αυτών
Φορμαέλλα Αράχωβας	Αράχωβα	Γάλα γίδινο ή πρόβειο ή μίγμα αυτών
Παρνασσού		

Πίνακας 1. Τα τυριά που έχουν χαρακτηριστεί στην Ελλάδα ως τυριά ΠΟΠ

1. 4 Μεταβολές των τυριών κατά την ωρίμανση

1.4.1. Μικροοργανισμοί

Στο γάλα απαντάται πλήθος μικροοργανισμών που προέρχονται είτε από το γάλα είτε από επιμολύνσεις κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης είτε προστίθενται σε αυτό ως οξυγαλακτική καλλιέργεια. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών συμβαίνουν σημαντικές μεταβολές στους μικροβιακούς αυτούς πληθυσμούς. Οι μεταβολές αυτές αρχίζουν με την έναρξη της τυροκόμησης. Επίσης, το γάλα είναι πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και αποτελεί έτσι εξαιρετικό υπόστρωμα ανάπτυξης για τα βακτήρια. Οι θερμοκρασίες τυροκόμησης που είναι 32-34°C, καθώς και εκείνες της πρώτης φάσης ωρίμανσης των τυριών που είναι 14-18 °C είναι ιδανικές για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων. Όμως για αρκετούς από

αυτούς, καθώς προχωράει η ωρίμανση, το περιβάλλον του τυριού γίνεται δυσμενές για την ανάπτυξή τους. Η παραγωγή του γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση της λακτόζης και η πτώση του pH με τη μείωση της υγρασίας λόγω της στράγγισης, την αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος, το μικροβιακό ανταγωνισμό που ασκεί η οξυγαλακτική χλωρίδα και τέλος η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης, προκαλούν μείωση των περισσότερων βακτηριακών πληθυσμών.

Η μείωση αυτή αφορά τους παθογόνους αλλά και εκείνους που προκαλούν αλλοιώσεις στα τυριά. Η συνδυασμένη επίδραση του pH και του NaCl έχει επιλεκτική δράση στα είδη των οξυγαλακτικών και μη βακτηρίων που επιβιώνουν στα τυριά. Τα είδη του γένους *Lactococcus* είναι ευαίσθητα στο χαμηλό pH και τη μεγάλη συγκέντρωση άλατος με συνέπεια ο πληθυσμός τους να μειώνεται. Τα είδη του γένους *Lactobacillus* είναι ανθεκτικά στο χαμηλό pH ενώ μερικά είδη του γένους αυτού είναι ανθεκτικά και στην υψηλή συγκέντρωση άλατος με αποτέλεσμα ο πληθυσμός τους να παραμένει σχετικά μεγάλος (Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetaki, 1992; Casalta et al., 1995).

Ο πληθυσμός των ζυμών αυξάνεται γρήγορα και παραμένει σε υψηλά επίπεδα καθ' όλη την ωρίμανση, κατά τη διάρκεια της οποίας μπορεί να εμφανίσει μικρή μείωση (Mansour and Alais, 1973). Οι ζύμες μπορούν ν' αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος pH (2,5-8,0) και θερμοκρασίας (4-44°C). Ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται γραμμικά όταν η περιεκτικότητα σε NaCl αυξάνεται (Vivier et al., 1994). Γι' αυτό στα τυριά επικρατούν κυρίως ανθεκτικά στο αλάτι είδη ζυμών (Mansour and Alais, 1973). Οι Westall και Filtenborg (1998), παρατήρησαν ότι οι ίδιες ζύμες που βρέθηκαν στα τυριά, βρέθηκαν και στους χώρους του τυροκομείου. Επίσης, κάθε τυροκομείο παρουσίαζε μια διαφορετική χλωρίδα ζυμών. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι ζύμες των τυριών προέρχονται από το περιβάλλον.

Οι ζύμες στο εσωτερικό των τυριών έχουν δύο σημαντικές λειτουργίες: την αφομοίωση του γαλακτικού οξέος (LA) καθώς και την παραγωγή ενώσεων που υποκινούν την ανάπτυξη των γαλακτικών βακτηρίων. Μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ που παράγεται από τα βακτήρια της καλλιέργειας εκκίνησης προς CO₂ και H₂O, και απαμινώνουν τα αμινοξέα, παράγοντας NH₂, αυτά τα δύο οδηγούν σε μία αύξηση του pH των τυριών από ~ 5 σε πάνω από 6.5. Κατά συνέπεια, ξεκινά μια αύξηση του pH, με το κέντρο του τυριού να είναι περισσότερο όξινο από την επιφάνεια. Στη συνέχεια, αυτή η αύξηση επιτρέπει την ανάπτυξη της αλοάντοχης γαλακτικής μικροχλωρίδας (Fox et al., 2004).

Συμβάλλουν, επίσης, στη διαδικασία της ωρίμανσης μέσω των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών δραστηριοτήτων τους που, αν και μικρές, είναι ενεργές στη διάρκεια αρκετών εβδομάδων της ωρίμανσης. Επιπλέον, προστατεύουν την επιφάνεια του τυριού από την

ξήρανση και επηρεάζουν τη γεύση με την παραγωγή πτητικών οξέων και καρβονυλικών ενώσεων (Siewert, 1986).

Παρατηρήθηκε ακόμα ότι, αντίθετα με τις ζύμες, οι μύκητες βρέθηκαν σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ τα κολοβακτήρια αυξάνονται στα πρώτα στάδια παραγωγής των τυριών και στη συνέχεια, μειώνονται με γρήγορο ρυθμό. Η μεγάλη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος σε συνδυασμό με το χαμηλό pH και τη χαμηλή θερμοκρασία επηρεάζουν την επιβίωσή τους ενώ δεν επηρεάζονται από τη συγκέντρωση του άλατος (Yanai et al., 1977). Εάν η πτώση του pH δεν είναι γρήγορη, αμέσως μετά την τυροκόμηση, και η θερμοκρασία δεν πέσει γρήγορα κάτω από τους 20°C, το τυρί εμφανίζει πολλές μικρές οπές που οφείλονται στην ανάπτυξη κολοβακτηρίων και στην παραγωγή αερίου.

Οι σταφυλόκοκκοι παρουσιάζουν μια σχετική αύξηση στην αρχή της ωρίμανσης και στη συνέχεια μειώνονται όταν το pH κατέλθει κάτω του 5. Αυτό οφείλεται στη συνδυασμένη δράση του γαλακτικού οξέος, του μικροβιακού ανταγωνισμού και των βακτηριοσινών (Litopoulou-Tzanetaki, 1977; Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetaki, 1992; Erkmen, 1995). Τα είδη του γένους *Staphylococcus* έχουν πρωτεολυτική και λιπολυτική δράση στα τυριά. Τα στελέχη του *S. aureus* που παράγουν εντεροτοξίνες, έχει αποδειχθεί ότι πολλαπλασιάζονται κατά τις 2-3 πρώτες ώρες μετά την έναρξη της πήξης. Αρχικές συγκεντρώσεις μικρότερες του 10^3 CFU/mL γάλακτος είναι χαμηλότερες από την τιμή που απαιτείται για την παραγωγή τοξίνης. Αντίθετα, ο πληθυσμός τους μειώνεται καθώς το pH ελαττώνεται και μηδενίζεται συνήθως μετά από 15-30 ημέρες ωρίμανσης (Erkmen, 1995; Μάντης, 2000).

Οι εντερόκοκκοι αναπτύσσονται στα τυριά μετά την πήξη του γάλακτος και προέρχονται είτε από το γάλα είτε από το περιβάλλον. Ανάλογα με το στάδιο της ωρίμανσης, η συγκέντρωση των κυττάρων μπορεί να φτάσει έως και 10^6 - 10^8 CFU/g τυριού (Fontecha et al., 1990; Basso et al., 1994). Σε τυρί κεφαλογραβιέρα έχουν ανιχνευτεί κυρίως στελέχη του *E. faecium* (Siafaras et al., 2008). Οι γνώμες για την επίδραση των εντερόκοκκων στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών είναι αντικρουόμενες. Η υψηλή συγκέντρωση των εντερόκοκκων μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τις οργανοληπτικές ιδιότητες σε μερικά τυριά (Thompson and Marth, 1986; Lopez-Diaz et al., 1995). Αντιθέτως, άλλες εργασίες αναφέρουν ότι οι εντερόκοκκοι επιδρούν θετικά στην παραγωγή των τυριών (Jensen et al., 1975b; Ordonez et al., 1987; Trovatelli and Schliesser, 1987; Centeno et al., 1999). Η μεγάλη πρωτεολυτική δράση ορισμένων εντερόκοκκων βελτιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Centeno et al., 1999). Επιπλέον, οι εντερόκοκκοι παράγουν εστεράσες που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της γεύσης (Tsakalidou et al., 1993). Ο *E. faecalis* έχει χρησιμοποιηθεί από πολλούς ερευνητές για την επιτάχυνση της ωρίμανσης και τη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Jensen et al., 1975a; Neviani et al. 1982; Hegazi,

1990; Ledda et al., 1994; Villani and Coppola, 1994; Tzanetakis et al., 1995). Επιπλέον, οι εντερόκοκκοι παράγουν βακτηριοσίνες που δρουν κατά των παθογόνων βακτηρίων όπως η *L. monocytogenes* και ο *S. aureus* (De Vuyst, 1994; Giraffa, 1995; Cintas et al., 1997; Aymerich et al., 2000; Franz et al., 2003; Moreno et al., 2006; Giraffa, 2007).

1.4.2. Η γλυκόλυση στην τυροκόμηση

Η κύρια βιοχημική οδός που έχουμε κατά τη διάρκεια της τυροκόμησης είναι η μετατροπή της λακτόζης σε γαλακτικό οξύ από τη δραστηριότητα της οξυγαλακτικής χλωρίδας και η μείωση του pH. Αυτή με τη σειρά της επηρεάζει διάφορες παραμέτρους των τυριών. Τα γαλακτικά βακτήρια έχουν όλα τα ένζυμα που χρειάζονται για την υδρόλυση της λακτόζης σε γλυκόζη και γαλακτόζη, αλλά και για τη βιομετατροπή των σακχάρων αυτών μέσω της γλυκολυτικής οδού σε πυροσταφυλικό οξύ. Στη συνέχεια, το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται σε γαλακτικό οξύ με αναγωγικό ένζυμο. Ένα μεγάλο μέρος της λακτόζης λόγω της γρήγορης απομάκρυνσης του τυροπήγματος αποβάλλεται με το τυρόγαλα. Το ίδιο συμβαίνει και με το γαλακτικό οξύ. Το ποσό της λακτόζης που κατακρατείται στο πήγμα, ζυμώνεται γρήγορα από την οξυγαλακτική χλωρίδα των τυριών. Έτσι λίγες ημέρες μετά την τυροκόμηση η λακτόζη έχει εξαντληθεί ή βρίσκεται σε ελάχιστη ποσότητα στα τυριά (El-Salam, 1987; Anifantakis, 1991). Το αλάτισμα μπορεί να μειώσει τη ζύμωση της λακτόζης (Turner and Thomas, 1980). Κατά το ξηρό ή υγρό αλάτισμα χρειάζεται αρκετός χρόνος για την είσοδο του άλατος στο εσωτερικό του πήγματος ώστε να διαχυθεί σε όλη τη μάζα του τυριού. Αυτό επιτρέπει τη γρήγορη ανάπτυξη της οξύτητας που οδηγεί στην αυξημένη θρόμβωση του πήγματος και τη χαμηλότερη περιεκτικότητά του σε νερό. Επίσης, πολύτιμη είναι η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων που μπορούν να μεταβολίσουν τη λακτόζη σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος (El-Salam, 1987; Anifantakis, 1991).

Κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων της ωρίμανσης, το pH των τυριών μειώνεται (Ramkumar et al., 1997). Αυτό οφείλεται κυρίως στη ζύμωση της λακτόζης και στην απελευθέρωση αμινοξέων και ελεύθερων λιπαρών οξέων που ακολουθούν την πρωτεόλυση και τη λιπόλυση (Mansour and Alais, 1972). Μετά από μια περίοδο σταθεροποίησης της τιμής του pH στα τυριά, ακολουθεί άνοδος η οποία οφείλεται κυρίως στον καταβολισμό του γαλακτικού οξέος από τις ζύμες ή στην παραγωγή αμμωνίας από την απαμίνωση των ελεύθερων αμινοξέων (Azarnia et al., 1997). Το pH κατά τη στράγγιση επηρεάζει διάφορες παραμέτρους όπως την περιεκτικότητα των τυριών σε ασβέστιο και την κατακράτηση της πυτιάς και της πλασμίνης στο τυρόπηγμα (Lawrence et al., 1984).

Η πλασμίνη ή αλκαλική πρωτεάση είναι η κύρια πρωτεϊνάση του γάλακτος η οποία είναι συνδεδεμένη με τα μικκύλια των καζεϊνών. Καθώς το pH μειώνεται, αποβάλλεται στον ορό

περισσότερο ασβέστιο (Lucey and Fox, 1993; Yun et al., 1995) και κατακρατείται περισσότερη πυτιά στο πήγμα με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη διάσπαση των πρωτεϊνών (Lawrence et al., 1987). Επίσης η πλασμίνη που δεσμεύεται στα τυριά, μειώνεται καθώς αποδεσμεύεται από τα μικύλια των καζεϊνών με τα οποία είναι συνδεδεμένη (Lawrence et al., 1987). Η αναλογία της καζεΐνης προς την υγρασία, σε συνδυασμό με το pH, καθορίζουν τη δομή των τυριών (Lawrence et al., 1987). Έτσι, η απώλεια υγρασίας κάνει τα τυριά πιο συμπαγή (Raphaelides and Antoniou, 1996). Το pH επηρεάζει γενικότερα τις φυσικές ιδιότητες των τυριών, όπως είναι η σκληρότητα ή η ικανότητα διαρροής (Olson et al., 1996; Creamer and Olson, 1982).

Μετά τον πρώτο μήνα της ωρίμανσης, τα τυριά γίνονται πιο εύθρυπτα, πιθανόν λόγω της διάσπασης των πεπτιδικών δεσμών (Aly, 1995). Η γρήγορη μείωση του pH κάτω του 5,2 τις πρώτες 24 ώρες, δημιουργεί συνθήκες στις οποίες η ανάπτυξη των κολοβακτηριδίων, και των άλλων ανεπιθύμητων μικροβίων περιορίζεται. Επίσης, επηρεάζεται και η ανάπτυξη ορισμένων οξυγαλακτικών και μη βακτηρίων καθώς και πολλών παθογόνων (Cogan and Daly, 1987; Pappas et al., 1996). Έτσι, η ορθή επιλογή της οξυγαλακτικής καλλιέργειας είναι πολύ σημαντικό θέμα γιατί επηρεάζει μέσω του pH πολλές παραμέτρους των τυριών.

1.4.3. Η πρωτεόλυση στην τυροκόμηση

Μετά τη γλυκόλυση, η δεύτερη σημαντική διεργασία που γίνεται στα τυριά είναι η πρωτεόλυση, δηλαδή η υδρόλυση των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Η πρωτεόλυση γίνεται σε δύο φάσεις διαδοχικά ή ταυτόχρονα. Η πρώτη, και πιο απλή, χαρακτηρίζεται από την υδρόλυση των πρωτεϊνών σε μικρότερου μοριακού βάρους πεπτίδια και τελικά σε αμινοξέα. Η δεύτερη περιλαμβάνει την αποικοδόμηση των αμινοξέων προς αζωτούχα ή μη συστατικά, ιδιαίτερα προς λιπαρά οξέα και αμμωνία. Αποτέλεσμα της υδρόλυσης των πρωτεϊνών είναι η αύξηση των υδατοδιαλυτών αζωτούχων συστατικών που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και στη συνέχεια η μείωση των προϊόντων υδρόλυσης λόγω της αποικοδόμησής τους (Manolkidis et al., 1970).

Η πρωτεόλυση ξεκινά με την προσθήκη της πυτιάς στο γάλα, η οποία προκαλεί τη διάσπαση των κ-καζεϊνών. Με τη βοήθεια των ιόντων Ca^{2+} δημιουργείται το πρωτεϊνικό πλέγμα στο οποίο παγιδεύονται και τα υπόλοιπα συστατικά του γάλακτος και δημιουργείται το πήγμα. Το μεγαλύτερο μέρος των πηκτικών ενζύμων διαφεύγει με τον ορό, αλλά κάποιο μέρος παραμένει στο πήγμα σε ποσοστό που εξαρτάται από την περιεκτικότητα σε υγρασία και το pH των τυριών (Grappin et al., 1985; Delacroixbuchet and Trossat, 1991; Delacroixbuchet and Fournier, 1992). Η πυτιά συνεχίζει να δρα στις πρωτεΐνες του τυριού δημιουργώντας πεπτίδια με μοριακό βάρος μεγαλύτερο του 1400 (Law, 1987; Fox, 1989). Η

διάσπαση των α_s -καζεΐνών από την πυτιά φαίνεται να είναι υπεύθυνη για το μαλάκωμα των τυριών κατά τα αρχικά στάδια της ωρίμανσης (Creamer and Olson, 1982). Στα τυριά η β-καζεΐνη είναι ανθεκτική στην πρωτεόλυση από την πυτιά αλλά υδρολύεται από την πλασμίνη (Singh et al., 1995). Ωστόσο, η δράση της πλασμίνης στα τυριά είναι περιορισμένη γιατί αδρανοποιείται κατά την παστερίωση του γάλακτος και επειδή το ιδανικό pH δράσης της είναι περίπου 7,5 (Fox, 1989).

Επίσης, οι πρωτεΐνες διασπώνται και από τις πρωτεϊνάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων που προστίθενται στο προς τυροκόμηση γάλα ή απαντούν σ' αυτό τυχαία. Οι πρωτεϊνάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων δρουν κυρίως στη β-καζεΐνη (Grappin et al., 1985; Singh et al., 1995). Ωστόσο, συνεισφέρουν λίγο στο σχηματισμό μεγάλων πεπτιδίων και δεν παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρωτεόλυση (Fox, 1989). Αντίθετα, οι πεπτιδάσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρωτεόλυση, οδηγώντας στο σχηματισμό πεπτιδίων μικρής αλυσίδας και αμινοξέων (Desmazeaud and Gripon, 1977; Broome and Limsowtin, 1998). Τα ένζυμα αυτά είναι εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά και τα τελευταία απελευθερώνονται στο πήγμα με το θάνατο των μικροβίων. Η συνεισφορά των πρώτων είναι μεγαλύτερη γιατί θεωρείται ότι τα βακτηριακά κύτταρα παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άθικτα.

Τα ενδοκυτταρικά ένζυμα, όπως είναι οι πεπτιδάσες, μπορεί να μην προσβάλλουν το υπόστρωμα (Fox, 1989). Το διαλυτό άζωτο των τυριών μειώνεται απότομα κατά τις πρώτες ημέρες εξ' αιτίας της αποβολής του με το τυρόγαλα. Όταν όμως αρχίσει η ωρίμανση, η ποσότητα του διαλυτού αζώτου αρχίζει να αυξάνεται (Manolkidis et al., 1970). Γενικά, το υδατοδιαλυτό άζωτο απεικονίζει το ρυθμό και το μέγεθος της πρωτεόλυσης. Οι μεταβολές στη συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων είναι περισσότερο εμφανείς μετά την 30^η ημέρα. Η συσσώρευση των ελεύθερων αμινοξέων συνοδεύεται από την εμφάνιση χαρακτηριστικής γεύσης (Polychroniadou and Vlachos, 1979).

Τα υδατοδιαλυτά συστατικά όπως είναι τα άλατα, τα αμινοξέα και τα πεπτίδια συνεισφέρουν σημαντικά στην ένταση του αρώματος και της γεύσης των τυριών (McGunan et al., 1979). Το άρωμα και η γεύση των τυριών οφείλονται κυρίως στο κλάσμα που περιέχει μικρά υδατοδιαλυτά μόρια με μοριακό βάρος μικρότερο του 1000 (Engels and Visser, 1994; Roudotalgaron, 1996). Τα αμινοξέα αποτελούν τις πρόδρομες ουσίες άλλων συστατικών που προκύπτουν από ενζυμικές διεργασίες και όχι μόνο (Vaforoulou et al., 1989; Visser, 1993). Σύμφωνα με άλλους όμως ερευνητές, η επίδραση των προϊόντων της πρωτεόλυσης στη γεύση είναι μεγαλύτερη από ότι η επίδραση άλλων μικρού μοριακού βάρους προϊόντων (McGunan et al., 1979). Ορισμένοι υποστηρίζουν ότι στη διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης των τυριών συμμετέχει ένα πλήθος πτητικών συστατικών (McSweeney, 1997; Urbach, 1997). Στα τυριά που ωριμάζουν για μεγάλο χρονικό διάστημα, όπως είναι τα σκληρά τυριά, η γεύση

τους μπορεί να αποδοθεί στα αμινοξέα που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης (Roudotalgaron, 1996).

1.4.4. Η λιπόλυση στην τυροκόμηση

Η τρίτη σημαντική βιοχημική διεργασία που έχουμε κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης είναι η λιπόλυση, δηλαδή η διάσπαση των γλυκεριδίων του λίπους και η παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων και κυρίως αυτών με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα όπως είναι το βουτυρικό, το καπρονικό, το καπρυλικό, και το καπρινικό οξύ από τα οποία σχηματίζονται κετόνες και κετονοξέα (Μάντης, 2000). Η υδρόλυση των γλυκεριδίων του λίπους προκαλείται κυρίως από τα λιπολυτικά ένζυμα που παράγονται από τους μικροοργανισμούς των τυριών. Σε αυτούς ανήκουν τα ψυχρότροφα βακτήρια τα οποία είναι αρκετά λιπολυτικά.

Οι λιπάσες των μικροβίων δεν αδρανοποιούνται με την παστερίωση και συνεχίζουν να δρουν στα τυριά. Αντίθετα οι ενδογενείς λιπάσες του γάλακτος, οι οποίες έχουν επίσης λιπολυτική δράση, αδρανοποιούνται κατά την παστερίωση και είναι ανενεργές σε pH μικρότερο του 6,0. Κατά συνέπεια, δεν παίζουν ρόλο στη λιπόλυση των τυριών (Deeth and Fitz-Gerald, 1976). Η παραδοσιακή πυτιά επηρεάζει σημαντικά τη λιπόλυση ενώ μερικές φορές κατά την παρασκευή των τυριών προσθέτουμε σκόπιμα λιπολυτικά ένζυμα (Bustamante et al., 2000; Virto et al., 2003). Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη λιπόλυση είναι η θερμοκρασία και ο χρόνος ωρίμανσης καθώς και το είδος του γάλακτος (Jin and Park, 1995).

Η χρήση πρόβειου γάλακτος ενισχύει την παραγωγή των λιπαρών οξέων με μικρή αλυσίδα, περισσότερο από το αγελαδινό γάλα (El-Salam, 1987). Ακόμη, η παρουσία γίδινου γάλακτος στο προς τυροκόμηση γάλα και η αναλογία του σε σχέση με το πρόβειο, μπορεί να μεταβάλλει το είδος των ελεύθερων λιπαρών οξέων που παράγονται (Freitas and Malcata, 1998). Η υψηλή θερμοκρασία και η αύξηση του χρόνου ωρίμανσης του τυριού αυξάνουν τα προϊόντα της λιπόλυσης.

Το λίπος θεωρείται σημαντικός παράγοντας στη διαμόρφωση της γεύσης του τυριού. Η χαμηλή περιεκτικότητα του γάλακτος σε λίπος έχει αρνητική επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της κεφαλογραβιέρας (Kondyli et al., 2003b). Η διάσπαση του λίπους κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών οδηγεί στο σχηματισμό προϊόντων τα οποία συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά τους (Kondyli et al., 2003a). Ωστόσο, η πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε ελεύθερα λιπαρά οξέα οδηγεί σε τυριά με ταγγή γεύση. Στην περίπτωση αυτή, το βουτυρικό οξύ συμμετέχει σε υψηλή αναλογία μαζί με ελεύθερα λιπαρά οξέα μεγαλύτερης αλυσίδας, όπως το καπρινικό, το λαυρικό, το μυριστικό, το παλμιτικό και το ελαϊκό (Efthymiou, 1967).

2. Πληθυσμοί μικροοργανισμών σε διάφορα τυριά

2.1. Οι ζύμες

Οι ζύμες είναι ευαίσθητες στις θερμοκρασίες παστεριώσεως, όμως απαντώνται συχνά στα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα οποία μολύνονται από το περιβάλλον των τυροκομείων. Ιδιαίτερης σημασίας θεωρούνται οι ζύμες που ζυμώνουν τη λακτόζη, διότι μερικές από αυτές χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες για την παρασκευή διάφορων γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ άλλες προκαλούν σφάλματα. Έτσι, η *Candida lipolytica* εκκρίνει λιπολυτικά ένζυμα και χρησιμοποιήθηκε ως καλλιέργεια στην παρασκευή του τυριού Blue. Η *Candida krusei* αναπτύσσεται συμβιωτικά με λακτοβακίλλους οξυγαλακτικών καλλιεργειών καθώς και με τον *Streptococcus thermophilus*. Η συμβιωτική αυτή ανάπτυξη οφείλεται στην ικανότητά της να οξειδώνει το γαλακτικό οξύ, να μειώνει την πίεση του οξυγόνου και να απελευθερώνει διάφορους παράγοντες αναπτύξεως, να δημιουργεί δηλαδή περιβάλλον κατάλληλο για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών των καλλιεργειών των τυριών (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 1989).

Η ανάπτυξη των ζυμών στην επιφάνεια του τυριού δεν αποτελεί έκπληξη, λόγω του χαμηλού pH, της σχετικά χαμηλής υγρασίας, της χαμηλής θερμοκρασίας ωρίμανσης και της υψηλής συγκέντρωσης άλατος στην επιφάνεια των τυριών. Οι Eliskases-Lechner και Ginzinger (1995), βρήκαν ότι ο πληθυσμός των ζυμών σε τυριά Tilsit από 14 γαλακτοκομεία, 3 ημέρες μετά την παρασκευή τους, κυμαίνονταν από <100 ως $>3 \times 10^6/\text{cm}^2$, με έναν μέσο όρο $10^4/\text{cm}^2$. Αλοάντοχες ζύμες βρίσκονται στην επιφάνεια των σκληρών τυριών και πιστεύεται, ότι με τα προϊόντα μεταβολισμού τους υποκινούν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών. Έτσι, στο τυρί Limburger ανεβάζουν μαζί με τους μικρόκοκκους το pH από περίπου 5 σε 5.8 και έτσι ευνοείται η ανάπτυξη του *Brevibacterium linens* και άλλων σχετικών μικροοργανισμών, που συμβάλλουν την αύξηση του διαλυτού αζώτου σ' αυτό το τυρί (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 1989).

Οι Tzanetakis και συν (1996), εξέτασαν δείγματα τυριών φέτας που προήλθαν από τρία εργοστάσια της κεντρικής και βόρειας Ελλάδας για τη μικροχλωρίδα ζυμών της επιφάνειάς τους. Οι αριθμοί των ζυμών έφθασαν στα υψηλότερα επίπεδα μετά από 4 ημέρες για κάποια τυριά, ενώ για μερικά άλλα η ανάπτυξη κορυφώθηκε μετά από δύο μήνες. Οι 188 απομονώσεις ταξινομήθηκαν κυρίως, ως *Saccharomyces cerevisiae* (47.8%), *Debaryomyces hansenii* (30.85%) και *Pichia farinosa* (11.17%). Λιγότερο συχνές απομονώσεις ήταν τα είδη *Candida intermedia*, *C. tropicalis*, *C. versatilis*, *C. catenulata*, *Pichia membranefasciens*, *Saccharomyces khuyveri* και *Kluyveromyces marxianus*. Τα περισσότερα στελέχη αναπτύχθηκαν παρουσία 7,5% και 15% NaCl. Επιπλέον, μόνο ένα στέλεχος *Pichia farinosa*

παρουσίασε πρωτεολυτική δραστηριότητα σε γάλα με άγαρ. Αντίθετα, καταγράφηκε αμινοπεπτιδική δραστηριότητα, για όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν. Εκτός από αμινοπεπτιδάσες, τα στελέχη παρουσίασαν εστερασική και λιπολυτική δραστηριότητα. Οι ζύμες που αναπτύσσονται στην επιφάνεια του τυριού φέτα μπορούν να συμβάλλουν στην πορεία ωρίμανσης του τυριού μέσω των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών δραστηριοτήτων τους (Tzanetakis et al, 1996).

Οι Ρουσσίδης και Τζανετάκης (2005), μελέτησαν την επιφανειακή μικροχλωρίδα επτά δειγμάτων ελληνικών παραδοσιακών τυριών, όπως το κασέρι, η γραβιέρα Νάξου και το κεφαλοτύρι, ως προς την ολική μεσόφιλη χλωρίδα, τα συνολικά αλοάντοχα βακτήρια, τις ζύμες, τους μύκητες και τα γαλακτικά αλοάντοχα βακτήρια. Σε τρία δείγματα ώριμου κασεριού ο πληθυσμός των ζυμών κυμάνθηκε από 4×10^5 έως 27×10^6 cfu/g, σε ένα δείγμα ώριμης γραβιέρας Νάξου ήταν 76×10^5 cfu/g, ενώ σε δείγματα φρέσκου, 20 ημερών και ώριμου κεφαλοτυριού οι ζύμες καταμετρήθηκαν μόνο στο ώριμο τυρί σε πληθυσμό 34×10^5 cfu/g. Από τα τρία δείγματα ώριμου κασεριού, απομονώθηκαν συνολικά 28 στελέχη ζυμών, ενώ από το ώριμο κεφαλοτύρι 11 στελέχη χωρίς να γίνει περαιτέρω ταυτοποίησή τους. Η ύπαρξη των ζυμών σε αυτά τα τυριά θεωρείται σημαντική, λόγω της πρωτεολυτικής και λιπολυτικής τους δραστηριότητας και επομένως της συμβολής τους στην εξέλιξη της ωρίμανσης αλλά και στα υπόλοιπα χαρακτηριστικά των τυριών (Ρουσσίδης και Τζανετάκης, 2005).

2.2. Οι μικρόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι

Οι μικρόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι έχουν ταξινομηθεί στην ίδια οικογένεια, αλλά δεν σχετίζονται φυλογενετικά. Ο *Micrococcus ssp.* έχει υψηλό ποσοστό G-C στο DNA και συμπεριλαμβάνεται στην κλάση των ακτινομυκήτων της τάξης *Eubacteria*, ενώ ο *Staphylococcus ssp.* έχει χαμηλή G-C και περιλαμβάνεται στην κλάση των κλωστριδίων. Αν και εμφανίζονται μορφολογικά παρόμοιοι κάτω από το μικροσκόπιο (συστάδες κόκκων), διαχωρίζονται ο ένας από τον άλλον (Fox et al., 2004).

Οι μικρόκοκκοι είναι ανθεκτικοί στη φουραζολιδόνη και τη λυσοσταφίνη και παράγουν οξύ από γλυκόζη μόνο κάτω από αερόβιες συνθήκες, ενώ οι σταφυλόκοκκοι είναι ευαίσθητοι στη φουραζολιδόνη και τη λυσοσταφίνη και παράγουν οξύ από γλυκόζη μόνο αναεροβίως (Fox et al., 2004). Οι φυλογενετικές και οι χημειοταξινομικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι το γένος *Micrococcus* είναι πολύ ετερογενές και πιο σχετικό με το γένος *Arthrobacter* απ' ό,τι με το γένος *Staphylococcus* (Fox et al., 2004). Πρόσφατα, έχει χωριστεί σε πέντε γένη, *Micrococcus sensu stricto*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Kytococcus* και *Dermacoccus*, και αυτά

τα γένη μαζί με άλλα όπως τα *Arthrobacter* και *Stomatococcus*, ανήκουν στην οικογένεια *Micrococcaceae* (Stackebrandt et al., 1995 & 1997).

Τα περισσότερα στελέχη σταφυλόκοκκων και μικρόκοκκων μπορούν να αναπτυχθούν παρουσία 10% αλατιού, κάτι το οποίο σημαίνει ότι ένα γενικής χρήσης υπόστρωμα που θα περιέχει αρκετό αλάτι για να εμποδίσει την ανάπτυξη των βακτηρίων της καλλιέργειας εκκίνησης θα ήταν ένα πολύ καλό εκλεκτικό υπόστρωμα (Fox et al., 2004). Οι πιο πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι οι μικρόκοκκοι ασκούν σημαντική επιρροή στη διαδικασία ωρίμανσης των τυριών (Fox, 1993). Από πολλούς ερευνητές δίνεται ιδιαίτερη σημασία στη συμβολή των μικροκόκκων στη γεύση και το άρωμα των τυριών, λόγω των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών τους ιδιοτήτων. Χρησιμοποιήθηκαν ως καλλιέργειες για την παρασκευή τυριών στελέχη μικροκόκκων με πρωτεολυτικές και λιπολυτικές ιδιότητες με ικανοποιητικά αποτελέσματα σε ότι αφορά τη βελτίωση της γεύσεως και το αρώματός τους (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 1989).

Στο τυρί κεφαλοτύρι, οι μικρόκοκκοι αυξάνονται κατά το στάδιο της αναθέρμανσης στη δράση των οποίων πιθανόν να οφείλεται και η μείωση του pH (σε συνέργεια με τους στρεπτοκόκκους, τα κολοβακτηριοειδή και τα Gram αρνητικά βακτήρια). Τα είδη της οικογένειας *Micrococcaceae* αυξάνονται σε αριθμό 10^7 cfu/g τον πρώτο μήνα της ωρίμανσης. Από το δεύτερο μήνα και μετά ο αριθμός τους ελαττώνεται και σε τυριά 6 μηνών βρίσκονται σε σχετικά υψηλά επίπεδα (περίπου 10^5 cfu/g). (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 1989).

Κατά την παρασκευή του Κεφαλοτυριού δεν παρατηρείται μείωση του pH κάτω από 5, ώστε να αναχαιτιστούν οι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί. Στα κεφαλοτύρια που κυκλοφορούν στην αγορά βρέθηκαν σταφυλόκοκκοι των υποομάδων I-VI και μικρόκοκκοι των υποομάδων 1-7. Μεταξύ των σταφυλόκοκκων, συχνότερα απομονώθηκε η υποομάδα I (*St. aureus*), ενώ από τους μικρόκοκκους η υποομάδα 3. Διαπιστώθηκε, ότι το τυρί αυτό προκάλεσε τροφική δηλητηρίαση από *St. aureus*, χωρίς όμως να εξακριβωθεί σε ποιο στάδιο σχηματίστηκε η τοξίνη. (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 1989).

Στην ελληνική γραβιέρα, ο αριθμός των σταφυλόκοκκων και μικρόκοκκων αυξάνεται σταδιακά ως την 45^η ημέρα ωρίμανσης (10^5 cfu/g), στη συνέχεια παρατηρείται ελάττωση (10^4 cfu/g), ενώ στο τέλος της ωρίμανσης σημειώνεται και πάλι αύξηση του αριθμού τους (10^5 cfu/g). (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 1989). Στο τυρί Cheddar, η προσθήκη καλλιέργειας εκκίνησης που περιέχει μικρόκοκκους, συμβάλλει θετικά στις οργανοληπτικές ιδιότητες του τυριού. Εντούτοις, δεν είναι τόσο σημαντική η ποσότητα, όσο το είδος των μικρόκοκκων, κάτι το οποίο είναι πρακτικής σημασίας, δεδομένου ότι δεν επηρεάζουν όλοι οι μικρόκοκκοι τις οργανοληπτικές ιδιότητες του τυριού (Fox, 1993).

Οι Ρουσσίδης και Τζανετάκης (2005), μελέτησαν την επιφανειακή χλωρίδα επτά δειγμάτων Ελληνικών Παραδοσιακών Τυριών, όπως το κασέρι, η γραβιέρα Νάξου και το κεφαλοτύρι. Συνολικά απομονώθηκαν 149 στελέχη βακτηρίων από τα οποία τα 68 ανήκαν στην οικογένεια *Micrococcaceae* και ταυτοποιήθηκαν μέχρι είδος βακτηρίου ενώ από τα υπόλοιπα, 39 στελέχη ανήκαν στην κατηγορία των ζυμών και 42 στα γαλακτικά βακτήρια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από τα ταυτοποιηθέντα στελέχη της οικογένειας *Micrococcaceae*, 28 στελέχη ανήκαν στο γένος *Staphylococcus*. Από τα στελέχη του γένους *Micrococcus* ταυτοποιήθηκαν συνολικά 3 είδη, με τον *Kytococcus sedentarius* να αποτελεί τον κυρίαρχο μικροοργανισμό σε όλα τα είδη των τυριών που εξετάστηκαν σε ποσοστό 65% των μικρόκοκκων (ιδιαίτερα στη γραβιέρα Νάξου και το κεφαλοτύρι), ενώ ακολουθούσαν οι *Kocuria varians* (12.5%) και *Micrococcus spp* (22.5%) ιδιαίτερα στο ώριμο κασέρι. Από τα στελέχη του γένους *Staphylococcus* ταυτοποιήθηκαν συνολικά 11 είδη με τους *S. capitis* (17.9% των απομονώσεων), *S. xylosus* (14.3% των απομονώσεων), *S. epidermidis* (10.7% των απομονώσεων), *S. cohnii* (10.7% των απομονώσεων) και *S. vitulis* (10.7% των απομονώσεων), να έχουν τα περισσότερα σε αριθμό στελέχη από όλα τα δείγματα των τυριών.

Οι Ρουσσίδης και Τζανετάκης (2005), από τις δοκιμές πρωτεόλυσης και λιπόλυσης που πραγματοποίησαν, διαπίστωσαν πως τα στελέχη της οικογένειας *Micrococcaceae* είχαν περισσότερο πρωτεολυτική δραστηριότητα και θετική δοκιμή αφομοίωσης κιτρικών αλάτων. Έτσι, πιθανώς να συμβάλλουν στην ωρίμανση και τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, όπως στην ανάπτυξη και εξέλιξη του αρώματος αυτών των τυριών.

2.3. Τα προπιονικά βακτήρια

Το γένος *Propiobacterium* αποτελείται από δύο κύριες ομάδες, τα «δερματικά» και τα «κλασικά» προπιονικά βακτήρια. Τα «δερματικά» προπιονικά βακτήρια βρίσκονται στην επιφάνεια του ανθρώπινου δέρματος και παρόλο που φαίνεται να βρίσκονται εκεί περιστασιακά, μελέτες έδειξαν ότι είναι άμεσα παθογόνοι μικροοργανισμοί (Horner et al., 1992). Αντίθετα, τα «κλασικά» προπιονικά βακτήρια χρησιμοποιούνται εκτεταμένα στα τυροκομεία ως καλλιέργειες εκκίνησης στην παραγωγή των τυριών ελβετικού τύπου και σ' αυτά οφείλεται η χαρακτηριστική γεύση και οσμή (flavor) αυτών των τυριών. Το χαρακτηριστικό άρωμα είναι αποτέλεσμα παραγωγής προπιονικού και οξικού οξέος, διακετυλίου και διάφορων αμινοξέων, όπως της λευκίνης και της προλίνης (Chaia et al., 1990). Το προπιονικό και οξικό οξύ που παράγεται, είναι φυσικές αντιμικροβιακές ενώσεις και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε άλλα ευαλλοίωτα τρόφιμα. Η παραγωγή βιομάζας, βιταμίνης B₁₂ και άλλων μεταβολιτών που παράγονται από το γένος *Propiobacterium*, έχουν μεγάλη οικονομική σημασία για τη βιομηχανία τροφίμων (Marcoux et al., 1992).

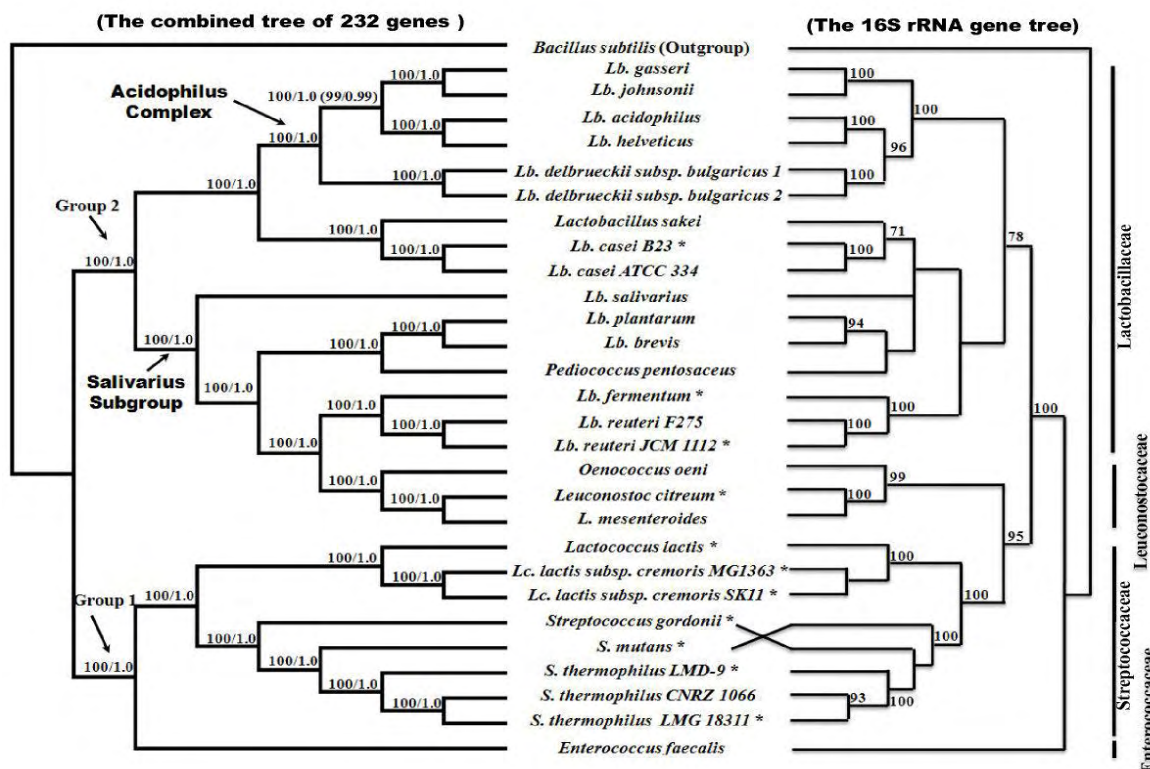
Αναλύσεις του τυριού Swiss ανέδειξαν την παρουσία διάφορων ειδών προπιονικών βακτηρίων (Drinan and Cogan, 1992; Baer and Ryda, 1992). Επειδή τα είδη αυτά συμβάλλουν στη γεύση, την οσμή και την υφή του τυριού, είναι σημαντική η γνώση της ορθής ταυτότητας αυτών των στελεχών, διότι μπορούν να βελτιώσουν την τελική ποιότητα του τυριού και άλλων ζυμούμενων προϊόντων (Britz and Reidel, 1994).

Οι Britz & Reidel (1994), μελέτησαν το τυρί Leerdammer ως προς την ποικιλομορφία των ειδών προπιονικών βακτηρίων. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα *Propionibacterium acidipropionici* και *P. jensenii* ήταν τα κυριότερα είδη, και η παρουσία τους στα τυριά ελβετικού τύπου είναι ιδιαίτερα σημαντική. Οι απομονώσεις *P. freudenreichii* ήταν μόνο δύο (Britz & Reidel, 1994), σε αντίθεση με τους Baer & Ryba (1992) που βρήκαν ότι το *P. freudenreichii* ήταν το κυριότερο είδος στα τυριά ελβετικού τύπου.

2.4. Τα γαλακτικά βακτήρια

2.4.1. Γενικά για τα γαλακτικά βακτήρια.

Τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) είναι μια ετερογενής ομάδα μικροοργανισμών, με πολλά κοινά χαρακτηριστικά. Είναι μία ομάδα Gram θετικών βακτηρίων που διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα με βάση τα ιδιαίτερα μορφολογικά, μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά τους (Εικόνα 1). Τα βακτήρια αυτά, είναι μη σπορογόνα, μη αερόβιοι κόκκοι και ραβδιά, χημειοοργανότροφα, τα οποία παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν κατά τη ζύμωση των υδατανθράκων (ομοζυμωτικά) ή γαλακτικό οξύ και άλλες ενώσεις όπως οξικό οξύ, αιθανόλη, διοξειδίο του άνθρακα και μυρμηγκικό οξύ (ετεροζυμωτικά). Τα γαλακτικά βακτήρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην τεχνολογία τροφίμων. Μπορούν να βελτιώσουν το άρωμα και την υφή των τροφίμων και αναστέλλουν την ανάπτυξη των αλλοιωγόνων βακτηρίων. Παρόλα αυτά, δεν είναι χρήσιμα όλα τα γαλακτικά βακτήρια. Μερικά απ' αυτά μπορεί να εμπλέκονται στην αλλοίωση των τροφίμων ή να είναι δυνητικά παθογόνα (Schleifer et al., 1995).



Εικόνα 1. Γενεαλογικό δέντρο βασισμένο σε τεχνικές 16S rRNA που απεικονίζει τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των LAB.

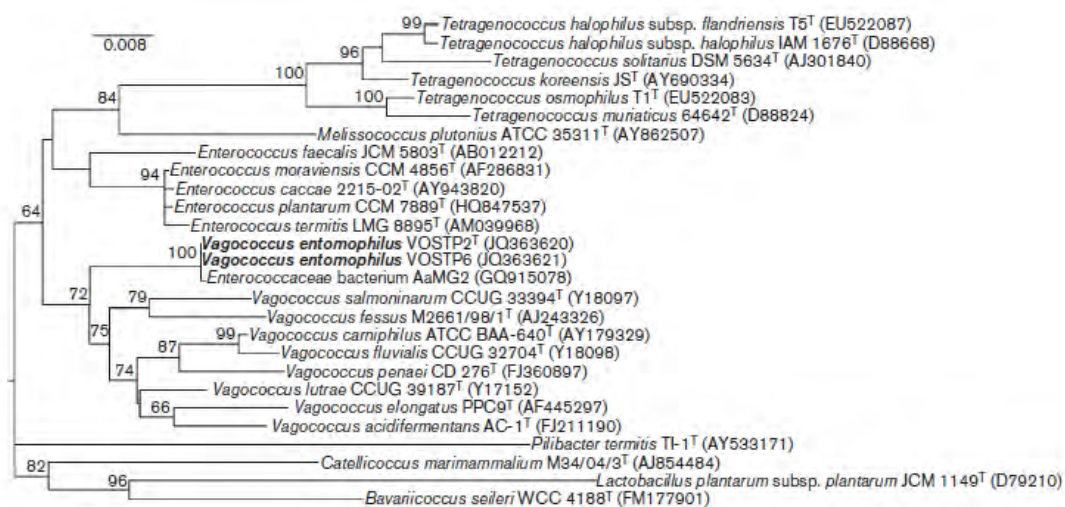
Η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι η κυριότερη μεταβολική διεργασία των γαλακτικών βακτηρίων, η οποία όμως είναι πολύ πιο σύνθετη και σημαντική απ' ό,τι μπορεί κανείς να φανταστεί (Axelsson, 1993; Axelsson, 1998). Τα γαλακτικά βακτήρια προσαρμόζονται άριστα στα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά και πηγές ενέργειας περιβάλλοντα, αλλά κατηγοριοποιούνται με βάση τη βιοσυνθετική τους ικανότητα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν και ορισμένες εξαιρέσεις απ' αυτά τα χαρακτηριστικά, εξαιτίας της ικανότητας ορισμένων ειδών να παράγουν καταλάση σε υποστρώματα που περιέχουν αιματίνη ή παρόμοιες ενώσεις (Wolf et al., 1991; Meisel and Hammes, 1994). Η παραγωγή της ψευδοκαταλάσης, από κάποιους λακτοβακίλλους, μπορεί επίσης να προκαλέσει σύγχυση στην ταυτοποίηση των LAB (Engesser and Hammes, 1994).

Με εξαίρεση το είδος *Streptococcus thermophilus*, το γένος *Streptococcus* αντιπροσωπεύει κυρίως παθογόνους στρεπτόκοκκους, συγκρινόμενο με τα τεχνολογικής σπουδαιότητας *Lactococcus* sp., που γενικά θεωρούνται μη παθογόνα και ασφαλή, και με το *Enterococcus* sp. Κάποια στελέχη του γένους *Streptococcus* μπορεί να εμπλέκονται σε περιστασιακές λοιμώξεις ενώ κάποια εγκαθίστανται στο γαστρεντερικό σωλήνα, και μερικά στελέχη του φαίνεται να κατέχουν κάποιον ρόλο στα τρόφιμα (Holzapfel et al., 2001).

Το γένος *Lactococcus* αποτελείται από 5 είδη: *Lc. lactis* (Schleifer et al., 1985), *Lc. garviae* (Collins et al., 1984), *Lc. piscium* (Williams et al., 1990), *Lc. plantarum* και *Lc. raffinolactis*

(Schleifer *et al.* 1985). Το είδος *Lc. lactis* έχει 3 υποείδη: *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *hordniae*, *Lc. lactis* subsp. *Lactis* και έναν βιότυπο, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. Το όνομα του τελευταίου δεν είναι όνομα ταξινομικής σημασίας και γι' αυτό είναι πιο σωστό να χρησιμοποιείται η έκφραση *Lc. lactis* subsp. *lactis* που ζυμώνει τα κιτρικά (Parente and Cogan, 2004). Ο *Lactobacillus xylosus* ταξινομήθηκε στο γένος ως *Lc. Lactis* subsp. *lactis* και ο *Lactobacillus hordniae* ως *Lc. lactis* subsp. *hordniae*. Η μεταφορά τους από το γένος *Lactobacillus*, έγινε με βάση τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και της σύνθεσης των λιπαρών οξέων. Το κοκοειδές σχήμα των κυττάρων του γένους καθώς και η ικανότητα τους να συνενώνονται και να σχηματίζουν αλυσίδες δημιουργούν προβλήματα για την σωστή ταξινόμησή τους.

Το γένος *Enterococcus* αποτελεί ξεχωριστό γένος και ανήκει μαζί με τα γένη *Melissococcus*, *Tetragenococcus* και *Vagococcus* στην οικογένεια *Enterococcaceae*. Με βάση την ανάλυση του 16S rRNA (Εικόνα 2), οι εντερόκοκκοι ανήκουν στα Gram θετικά βακτήρια με χαμηλή (<50%) περιεκτικότητα G+C στο DNA τους. Από το 1984 μέχρι σήμερα, στο γένος *Enterococcus*, έχουν εισαχθεί 35 διαφορετικά είδη. Τα δύο καινούρια είδη που βρέθηκαν σε γαλακτοκομικά προϊόντα, ο *Ent. saccharominimus* (Vancanneyt *et al.*, 2004) και ο *Ent. italicus* (Fortina *et al.*, 2004), τελικά αποτελούν στέλεχη του ίδιου είδους (Naser *et al.*, 2005). Το ίδιο ισχύει και για τα είδη *Ent. casseliflavus* και *Ent. flavescens*, τα οποία αποτελούν τελικά ένα είδος ύστερα και από μελέτες και άλλων ερευνητών (Descheemaeker *et al.*, 1997). Τέλος, μια απομόνωση από ελληνικό γιαούρτι, που θεωρούνταν ως άτυπο στέλεχος *Streptococcus thermophilus*, μπόρεσε να ταξινομηθεί ως *Enterococcus* με την τεχνική 16S rRNA.



Εικόνα 2. Γενεαλογικό δέντρο βασισμένο σε τεχνικές 16S rRNA που απεικονίζει τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των εντερόκοκκων.

2.4.2. Γαλακτικά βακτήρια ελληνικών παραδοσιακών τυριών

Η μελέτη της αυτόχθονης γαλακτικής μικροχλωρίδας των παραδοσιακών τυριών της Ελλάδος αποτέλεσε τα τελευταία χρόνια αντικείμενο έρευνας με σκοπό τη βελτίωση της μικροβιολογικής κατάστασης των τυριών. Η γαλακτική μικροχλωρίδα που επικρατεί (Πίνακας 2) συμβάλλει στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών με τις βιοχημικές της δράσεις. Η Φέτα αποτελεί το πιο γνωστό ελληνικό τυρί. Τα γαλακτικά βακτήρια αποτελούν την επικρατέστερη μικροχλωρίδα καθ' όλη τη διάρκεια την ωρίμασης και συντήρησης του τυριού (Tzanetakis και Litopoulou-Tzanetaki, 1992). Οι λακτοβάκιλλοι αποτελούν το 75,72% του πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων ενώ οι εντερόκοκκοι και οι πεδίοκοκκοι αποτελούν μόλις το 17,14% και 7,14%, αντίστοιχα. Ο *Lactobacillus plantarum* είναι το επικρατέστερο είδος ανάμεσα στους λακτοβακίλλους και αντιπροσωπεύει το 47,8% των απομονώσεων από το MRS agar pH 6,2. Άλλα είδη λακτοβακίλλων που βρέθηκαν στη Φέτα είναι οι *Lb. casei*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. confusus*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri* και *Lb. hilgardii*. Από τους πεδίοκοκκους, επικρατέστερο είδος αποτελεί ο *Pediococcus pentosaceus* με ποσοστό απομόνωσης 7,1% και από τους εντεροκόκκους ο *Enterobacterium. durans* με ποσοστό απομόνωσης 6,0%.

Το τυρί Τελεμές είναι επίσης ένα από τα πιο γνωστά ελληνικά λευκά τυριά άλμης, όπως και η Φέτα. Η πορεία των γαλακτικών βακτηρίων στο τυρί είναι παρόμοια με τη Φέτα (Tzanetakis και Litopoulou-Tzanetaki, 1992). Οι λακτοβάκιλλοι επικρατούν σε σχέση με τα άλλα γένη των γαλακτικών βακτηρίων με τον *Lb. plantarum* να είναι το πιο συχνά εμφανιζόμενο είδος (65,8% των συνολικών απομονώσεων από MRS agar). Άλλα είδη λακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από τον Τελεμέ είναι οι *Lb. casei*, *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*, *Lb. coryneformis*, *Lb. xylosus* και *Lb. brevis*. Οι λακτόκοκκοι επικρατούσαν στην αρχή της ωρίμασης με τον *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* να αποτελεί το 5,4% των απομονώσεων. Μια άλλη σημαντική ομάδα γαλακτικών βακτηρίων που υπάρχει στο τυρί είναι τα *Leuconostoc* με επικρατέστερο είδος το *Ln. paramesenteroides* (7,1%). Τα *Leuconostoc* αυξάνονται μέχρι και τον πρώτο μήνα και έπειτα μειώνονται. Οι εντερόκοκκοι δεν βρίσκονται σε υψηλούς πληθυσμούς και το επικρατέστερο είδος είναι ο *Enterobacterium. faecium* με ποσοστό απομόνωσης 3,3%.

Το Κεφαλοτύρι θεωρείται το παλιότερο από τα σκληρά τυριά της Ελλάδος. Η γαλακτική μικροχλωρίδα είναι η επικρατέστερη σε όλα τα στάδια παρασκευής και ωρίμασης του τυριού (Litopoulou-Tzanetaki et al, 2011). Οι λακτοβάκιλλοι και οι εντερόκοκκοι επικρατούν σε σχέση με τα άλλα γένη των γαλακτικών βακτηρίων ενώ τα *Leuconostoc*, ο *Str. thermophilus*

και οι λακτόκοκκοι εξαφανίζονται στα πρώτα στάδια της ωρίμασης. Ο *Ent. faecium* είναι το πιο συχνά εμφανιζόμενο είδος ανάμεσα στους εντεροκόκκους και αντιπροσωπεύει το 35,5% των συνολικών απομονώσεων σε τυρί ηλικίας 4 μηνών. Επίσης, στο Κεφαλοτύρι απαντώνται και ο *Ent. durans* και *Ent. faecalis* σε μικρότερα ποσοστά. Οι *Lb. plantarum* και *Lb. Casei* subsp. *casei* αντιστοιχούν στο 18,4 και 15,8% του συνολικού πληθυσμού των γαλακτικών βακτηρίων σε τυρί ηλικίας 4 μηνών και είναι τα επικρατέστερα είδη από τους λακτοβακίλλους. Άλλα είδη λακτοβακίλλων που βρίσκονται στο τυρί είναι οι *Lb. buchneri*, το *Lb. brevis*, το *Lb. casei* subsp. *rhamnosus*, το *Lb. cellobiosus* και το *Lb. casei* subsp. *alactosus*.

Προϊόν	Είδη γαλακτικών βακτηρίων
Φέτα	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. coryneformis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Ln. paramesenteroides</i> , <i>Ln. dextranicum</i>
Τελμερές	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. coryneformis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lc. Lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Ln. paramesenteroides</i> , <i>Ln. dextranicum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Κεφαλοτύρι	<i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Ln. paramesenteroides</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>Pediococcus sp.</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
Τουλουμεσίο	16 βακτήρια με επικρατούντα τα <i>E. faecium</i> , <i>L. plantarum</i> και <i>L. brevis</i>
Ξυνοτύρι	11 γαλακτικά βακτήρια με επικρατούντα <i>L. plantarum</i> και <i>E. faecalis</i>
Κοπανιστή	15 είδη γαλακτικών βακτηρίων με επικρατέστερα <i>L. plantarum</i> και <i>L. casei</i>
Μπάτζος (πρόβειο)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i>
Κρασotyρι	14 γαλακτικά βακτήρια με κυρίαρχα είδη <i>L. plantarum</i> και <i>Enterococcus faecium</i>
Λευκό τυρί άλμης από κατσικίσιο γάλα	<i>Lactobacillus</i> (10 είδη), <i>Enterococcus</i> (3 είδη), <i>Leuconostoc</i> (5 είδη), <i>Lactococcus</i> (1 είδος)
Ανεβατό	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. raffinolactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Ln. dextranicum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>L. viridescens</i> , <i>L. coryneformis</i>
Μανούρα	Διάφορα γαλακτικά βακτήρια (15 είδη) με επικρατέστερα τα <i>L. brevis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> και <i>W. paramesenteroides</i>
Κατίκι Δομοκού	Διάφορα γαλακτικά βακτήρια (14 είδη) με επικρατέστερο το <i>Enterococcus durans</i>
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. plantarum</i>

Πίνακας 2. Επικρατέστερα είδη της γαλακτικής μικροχλωρίδας σε μερικά ελληνικά Παραδοσιακά τυριά.

Μια πρόσφατη μελέτη του Σάμελη και συν. (Samelis et al., 2010) κατέδειξε ότι σε δείγματα γραβιέρας, πέντε εβδομάδες μετά την ωρίμανση, στη μικροβιακή χλωρίδα κυριαρχούσαν οι μεσοφιλικόι λακτοβάκιλλοι *Lb. casei/paracasei* (67.5%) and *Lb. plantarum* (16.3%), οι οποίοι δεν συμπεριλαμβάνονταν στις αρχικές καλλιέργειες. Αντίθετα τα βακτήρια *S. thermophilus*, *Lactococcus lactis* και *Leuconostoc sp.* που περιλαμβάνονταν στις αρχικές

καλλιέργειες απομονώθηκαν σε συχνότητες 3.8%, 0.6% and 1.9%, αντίστοιχα. Ο *Enterococcus faecium* (9.4%) and ο *Enterococcus durans* (0.6%) απομονώθηκαν ανάμεσα στους κυρίους λακτοβακίλους και γενικά σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν, οι εντερόκοκκοι βρέθηκαν σε πληθυσμούς 10 ως 100 φορές μικρότερους από ότι οι μεσοφιλικόι λακτοβάκιλοι (Samelis et al., 2010).

Ο Σιαφάρας και συν (2008) μελέτησαν τη μικροβιακή χλωρίδα στην επιφάνεια δειγμάτων κεφαλογραβιέρας, και διαπίστωσαν ότι αποτελούνταν κυρίως από βακτήρια της οικογένειας *Micrococcaceae*, εντεροκόκκους και βακίλους, τα οποία ήταν διαφορετικά από άλλου είδους τυριά (Bockelmann et al, 1997, Elikases-Lechner & Ginzinger 1995a, 1995b, Reps 1993). Με τη μέθοδο SDS-PAGE ταυτοποιήθηκαν τα 14 στελέχη των gram θετικών και καταλάση αρνητικών κόκκων ως *E. faecium*, το οποίο αποτελεί κοινό είδος των ελληνικών τυριών (Psoni et al 2003, Tzanetakis & Litopoulou-Tzanetaki 1992). Από τα στελέχη gram θετικών και καταλάση θετικών κόκκων που απομονώθηκαν, τα 15 ταυτοποιήθηκαν στην οικογένεια *Staphylococciae* και το ένα χαρακτηρίστηκε ως *Kocuria* (*Micrococcus*). Με βιοχημικές μεθόδους τα είδη των σταφυλοκόκκων ταυτοποιήθηκαν ως *S. capitis*, *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*. Βέβαια, η παρουσία του *S. saprophyticus* είναι ανεπιθύμητη, επειδή είναι δυνητικά παθογόνο για τον άνθρωπο (Bockelmann & Hoppe-Seyler 2001). Τέλος, απομονώθηκαν και 26 είδη σπορογόνων βακίλλων.

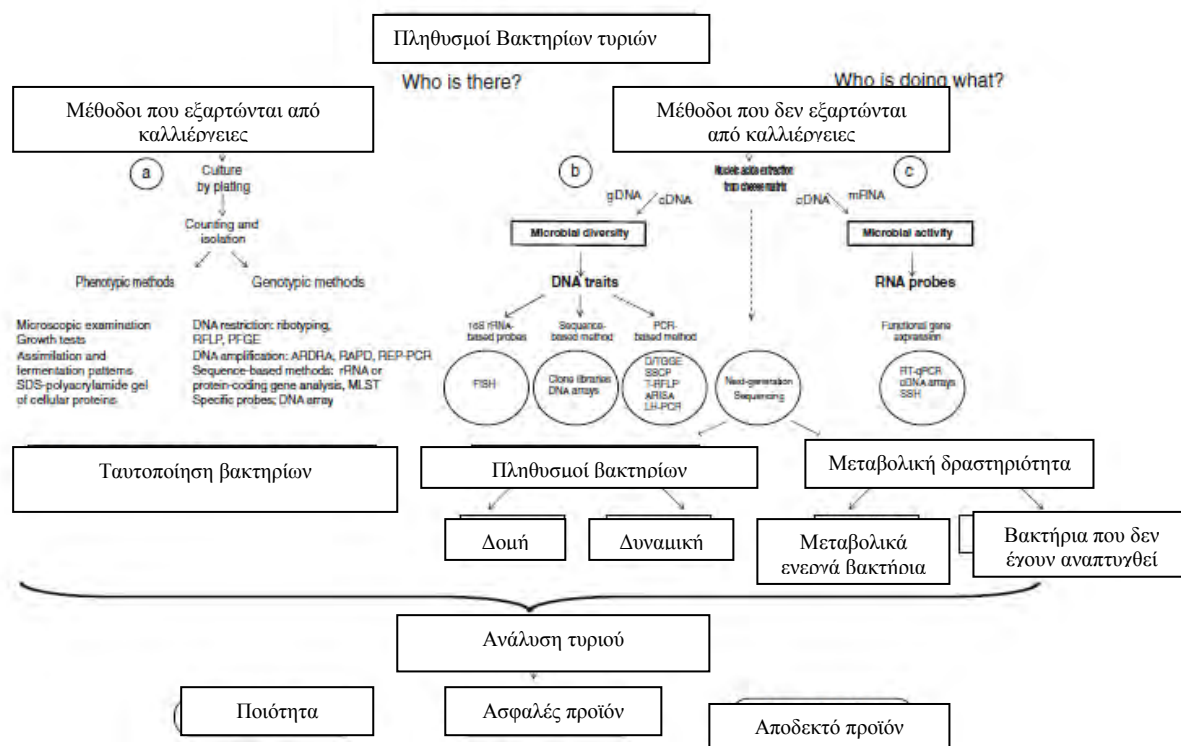
3. Μέθοδοι ταυτοποίησης, αρίθμησης και χαρακτηρισμού των βακτηρίων στα τρόφιμα

Τα τελευταία χρόνια, έχουν συζητηθεί εκτενώς τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μεθόδων ταυτοποίησης των βακτηρίων που εξαρτώνται από τις καλλιέργειες και αυτών που δεν εξαρτώνται. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι συνθήκες που εφαρμόζονται στις μικροβιακές καλλιέργειες, δεν απεικονίζουν πλήρως τους πληθυσμούς των βακτηρίων που υπάρχουν στα εξετασθέντα δείγματα. Προσεγγίσεις ταυτοποίησης βακτηρίων με μεθόδους που εξαρτώνται από καλλιέργειες, έδειξαν περιορισμούς στο ρυθμό ανάκτησης των βακτηρίων και τα είδη που απομονώθηκαν, δεν αντικατατρόπτιζαν πραγματικά τη βακτηριακή σύνθεση των δειγμάτων που εξετάστηκαν (Temmerman et al, 2004). Η κύρια αιτία για αυτό, είναι η έλλειψη γνώσεων όσο αφορά τις πραγματικές συνθήκες κάτω από τις οποίες τα βακτήρια αναπτύσσονται στο φυσικό τους ξενιστή (και στην συγκεκριμένη περίπτωση τα τρόφιμα), και η δυσκολία ανάπτυξης μέσω καλλιέργειας που παρομοιάζουν με ακρίβεια τις συνθήκες αυτές (Ercolini, 2004). Συνεπώς, τα είδη των βακτηρίων που βρίσκονται σε μικρούς αριθμούς, συχνά in vitro, υπερκαλύπτονται από τα πολυάριθμα είδη

βακτηρίων, καθώς μερικά είδη βακτηρίων δεν μπορούν να αναπτυχθούν *in vitro*, παρόλου που υπάρχουν και είναι μεταβολικά ενεργά στα τρόφιμα.

3.1 Μέθοδοι που εξαρτώνται από καλλιέργειες

Ο Ercolini και συν. (2001) προσδιόρισε ότι οι μέθοδοι που εξαρτώνται από καλλιέργειες είναι αυτές που περιλαμβάνουν απομόνωση και καλλιέργεια των βακτηρίων πριν την ταυτοποίηση τους σύμφωνα με τα φαινοτυπικά ή γενοτυπικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 3) (Beresford et al., 2001; Coeuret et al., 2003; Ward and Roy, 2005; Jany and Barbier, 2008). Βέβαια, οι μέθοδοι αυτοί δεν μπορούν να εφαρμοσθούν με τον ίδιο τρόπο σε όλα τα δείγματα τυριών. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να αναπτυχθούν οι κατάλληλες μέθοδοι ή συνδυασμοί μεθόδων, που μπορούν να εφαρμοσθούν σε κάθε είδος τυριού (Ercolini et al., 2001; Martin-Platero et al., 2009). Μόνο ένα μικρό μέρος των βακτηρίων μπορεί να ανακτηθεί στα μέσα καλλιέργειας με τυχαία επιλογή και συχνά τα βακτήρια που έχουν απομονωθεί, δεν φαίνεται να αντιπροσωπεύουν την πραγματική ταξινομική κατάσταση των βακτηρίων που παρουσιάζουν ενεργή έκφραση γονιδίων (Coppola et al., 2001; Martin-Platero et al., 2009; Van Hoorde et al., 2010a). Επιπρόσθετα, οι μέθοδοι που εξαρτώνται από τις καλλιέργειες είναι χρονοβόρες και δεν είναι δυνατό να απομονωθούν όλα τα υπάρχοντα είδη βακτηρίων (Muyzer et al., 1993).



Εικόνα 3. Διάγραμμα ροής για μεθόδους που εξαρτώνται και δεν εξαρτώνται από καλλιέργειες, για τον προσδιορισμό των βακτηριακών πληθυσμών των τυριών.

Οι αριθμοί των λακτοβακίλλων είναι δυνατόν να μην εκτιμηθούν σωστά λόγω των περιορισμών και ορίων που υπάρχουν στην τεχνική καταμέτρησης αποικιών στο άγαρ. Μια μελέτη των ολικών λακτοβακίλλων σε τυρί Parmigiano Reggiano, έδειξε ότι οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί λακτοβακίλλων ανακτήθηκαν σε άγαρ που παρασκευάστηκε από ορό γάλακτος και τυρί που είχε ωριμάσει, διευκολύνοντας έτσι την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών που υπήρχαν στις αρχικές καλλιέργειες. Τα απαιτητικά σε ενέργεια βακτήρια είχαν καλύτερες συνθήκες ανάπτυξης σε αυτού του είδους άγαρ καλλιέργειας (De Dea Lindner et al., 2008).

Επίσης, ο Temmerman και συν. (2004) έχουν καταγράψει τις φαινοτυπικές και γενοτυπικές μεθόδους που είναι απαραίτητες για την ταυτοποίηση και το χαρακτηρισμό των λακτοβακίλλων. Για τον χαρακτηρισμό των στελεχών τα φαινοτυπικά τεστ, προσφέρουν πληροφορίες για τις μεταβολικές ικανότητες των βακτηρίων, ενώ το πλεονέκτημα των γενοτυπικών μεθόδων είναι η σταθερότητα του γονιδιώματος, του οποίου η σύνθεση είναι ανεξάρτητη από τις συνθήκες προετοιμασίας του δείγματος και καλλιέργειας (Fitzsimons et al., 1999).

3.1.1 Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των βακτηρίων

Για την ταυτοποίηση των βακτηριακών στελεχών η αλληλούχιση των γονιδίων 16S ή 23S rRNA, είναι ένα πολύτιμο εργαλείο με υψηλή διακριτική ικανότητα. Οι ζύμες που απομονώνονται από δείγματα τροφίμων, ταυτοποιούνται συχνά με αλληλούχιση της D1/D2 περιοχής του 26S rRNA γονιδίου. Για τη διαφοροποίηση άλλων βακτηρίων όπως για παράδειγμα των λακτοβακίλλων, άλλα γονίδια έχουν θεωρηθεί ως στόχοι, συμπεριλαμβανομένου τα γονίδια που παράγουν πρωτεΐνες *rpoB*, *recA*, and *pheS* (Martin-Platero et al., 2009; Rantsiou et al., 2004; Torriani et al., 2001; Van Hoorde et al., 2010).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης PCR αποτελεί ένα χρήσιμο και γρήγορο εργαλείο ταυτοποίησης βακτηρίων που έχουν απομονωθεί σε καλλιέργειες δειγμάτων τροφίμων. Έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα ταυτοποίησης βακτηρίων όπως για παράδειγμα για τα βακτήρια *Lactobacillus helveticus* (Fortina et al., 2001), *Streptococcus thermophilus* (Lick et al., 1996), *Lactococcus lactis* (Corroler et al., 1998), και *Lactobacillus delbrueckii* (Torriani et al., 1999), οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη μελέτη των βακτηριακών πληθυσμών των τυριών (Dolci et al., 2008; Fonseca et al., 2013; Fortina et al., 2003; Robert et al., 2009).

Επιπρόσθετα, η περιοχή internal transcribed sequences (ITS) μεταξύ των rRNA γονιδίων μπορεί να παράγει γενετικά προφίλ που είναι χαρακτηριστικά για κάθε βακτηριακό είδος. Οι Jensen και συν. (1993) και οι Arroyo-Lopez και συν. (2006) σχεδίασαν εκκινητές και ανέπτυξαν τη μέθοδο για ταυτοποίηση βακτηρίων και ζυμών, αντίστοιχα. Αυτή η προσέγγιση

μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα όσο αφορά τον προσδιορισμό των ειδών και σε ορισμένες περιπτώσεις για τον προσδιορισμό του είδους του στελέχους (Alves et al., 2012; Jeyaram et al., 2008, Tanasupawat et al., 2011). Βέβαια τα διάφορα στελέχη παρουσιάζουν διαφορετικά γενοτυπικά, φυσιολογικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά τα οποία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι ταυτοποίησης των διάφορων στελεχών του ίδιου είδους, όπως για παράδειγμα η μέθοδος restriction fragment length polymorphism (RFLP), η μέθοδος random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR, η μέθοδος repetitive element sequenced-based (Rep)-PCR, ή η μέθοδος multilocus sequence typing (MLST).

Μεταξύ των τεχνικών της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, η τεχνική RAPD-PCR έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε δείγματα τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία στην ανίχνευση της παρουσίας και της ανάπτυξης των λακτοβακίλλων των αρχικών καλλιεργειών στο τυρί, στο κρέας καθώς και σε άλλα τρόφιμα (Charteris et al., 1997; Dolci et al., 2008; Giraffa and Neviani, 2000; Fitzsimons et al., 2001; Urso et al., 2006). Συγκεκριμένα, η μέθοδος (GTG)₅-PCR έχει αποδειχτεί χρήσιμο εργαλείο για τη διαφοροποίηση των διάφορων στελεχών των λακτοβακίλλων σε διάφορα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου και τυρί (Gevers et al., 2001; Cocolin et al., 2004; Terzic-Vidojevic et al., 2007; De Angelis et al., 2007).

3.2 Μέθοδοι που δεν εξαρτώνται από καλλιέργειες

Τα τελευταία χρόνια για την ταυτοποίηση των βακτηρίων σε γαλακτοκομικά προϊόντα (Alessandria et al., 2010; Dolci et al., 2008; Randazzo et al., 2006; Rantsiou et al., 2008), στο κρέας (Albano et al., 2008; Cocolin et al., 2009; Nguyen et al., 2013), και σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης (Randazzo et al., 2012; Tofalo et al., 2013), έχουν εφαρμοσθεί μέθοδοι τόσο που εξαρτώνται από καλλιέργειες όσο και μέθοδοι που δεν εξαρτώνται από καλλιέργειες. Στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως και στο τυρί, οι μέθοδοι που δεν εξαρτώνται από καλλιέργειες γρήγορα αναγνωρίστηκαν ως ένα πολύτιμο εργαλείο, για τη μελέτη της βιοποικιλίας και ταυτοποίησης των βακτηριακών στελεχών (Ercolini et al. 2012). Οι μέθοδοι αυτοί, στηρίζονται στην απομόνωση του DNA ή του RNA από το τυρί. Στη συνέχεια το DNA ή το cDNA (μετά την αντίστροφη μεταγραφή του RNA) επεκτείνεται με την PCR, αντιγράφεται και αλληλουχείται προκειμένου να δημιουργηθούν οι γενετικές βιβλιοθήκες για την ταυτοποίηση των ειδών. Σε αντίθεση, το RNA είναι ένας καλύτερος δείκτης της βακτηριακής ζωτικότητας και δραστηριότητας δεδομένου του ότι αποδομείται γρήγορα μετά τον κυτταρικό θάνατο (Cocolin et al., 2013; Santarelli et al., 2008).

3.2.1 Άμεση ταυτοποίηση βακτηρίων

Η άμεση ταυτοποίηση των βακτηρίων κατά τη διάρκεια ωρίμανσης των τυριών και στο τελικό προϊόν μπορεί να επιτευχθεί με την εφαρμογή διάφορων μεθόδων PCR (Πίνακας 3), όπως για παράδειγμα PCR denaturing gradient gel electrophoresis PCR-DGGE, PCR temperature gradient gel electrophoresis (TGGE), single-strand conformation polymorphism PCR (SSCP-PCR), terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP), length heterogeneity PCR (LH-PCR), και automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) techniques (Coppola et al., 2008).

Techniques	Applications to cheese samples	References
PCR-DGGE (TGGE)	Artisanal fresh sheep cheese (Croatia)	Pogačić et al. (2010b)
	Danish raw milk cheese	Masoud et al. (2010)
	Types of Gouda cheese (Belgium)	Van Hoorde et al. (2010a); Van Hoorde et al. (2008)
	Artisanal Pecorino Crotonese cheeses (Italy)	Randazzo et al. (2010); Randazzo et al. (2006)
	Surface of five traditional Italian cheeses	Fontana et al. (2010)
	Three batches of Castelmagno PDO cheese (Italy)	Dolci et al. (2010); Dolci et al. (2008)
	Two batches of a blue-veined cheese (Spain)	Alegria et al. (2011)
	Istrian cheese (Croatia)	Fuka et al. (2010)
	Five artisanal cheese samples (Slovenia)	Lorbeg et al. (2009)
	Fontina PDO cheese (Italy)	Dolci et al. (2009)
	Gorgonzola rinds and maturing shelf (Italy)	Cocolin et al. (2009)
	Calenzana, Corsican raw milk (goat and sheep) cheese	Casalta et al. (2009)
	Traditional Spanish Casin cheese	Alegria et al. (2009)
	Feta cheeses produced by different Greek manufacturers	Rantsiou et al. (2008b)
	12 months ripened Pannigiano Reggiano cheeses (Italy)	Gala et al. (2008)
	“Robiola di Roccaverano” PDO cheese (Italy)	Bonetta et al. (2008)
	Quesaila Arochena and Torta Arochena cheese (Spain)	Martin-Platero et al. (2009)
	Egyptian Domiati cheese	El-Baradei et al. (2007)
	Tina wood vats used in the Ragusano cheese	Licitra et al. (2007)
	Spanish, blue-veined Cabrales cheese	Florez and Mayo (2006a); Florez and Mayo (2006b)
	Swiss-type, semi-hard and red-smear cheeses (France)	Ogier et al. (2004)
	Stilton cheese (UK)	Ercolini et al. (2003b)
	Sicilian Ragusano cheese (Italy)	Randazzo et al. (2002)
	Mozzarella cheese (Italy)	Ercolini et al. (2004); Ercolini et al. (2001)
SSCP	Livarot cheese (France)	Mounier et al. (2009)
	Saint-Nectaire-type technology cheese (France)	Saubusse et al. (2007)
	Two types of French red-smear cheese (France)	Feurer et al. (2004a)
	Salers cheese (France)	Callon et al. (2006); Duthoit et al. (2005); Duthoit et al. (2003)
	Semi-hard cheese (France)	Delbès and Montel (2005)
T-RFLP	Farm productions of Saint-Nectaire cheese (France)	Delbès et al. (2007)
	Camembert cheese (Canada)	Arteau et al. (2010)
LH-PCR	Smear-ripened Tilsit cheese (the Netherlands)	Rademaker et al. (2005)
	Grana Padano cheese (Italy)	Gatti et al. (2008)
ARISA	Spanish farmhouse cheese (Spain)	Martin-Platero et al. (2009)
	Camembert cheese (Canada)	Arteau et al. (2010)

Πίνακας 3. Μέθοδοι που δεν εξαρτώνται από καλλιέργειες και έχουν εφαρμοσθεί για την ταυτοποίηση των βακτηριακών πληθυσμών τυριών.

Η αλληλούχιση του 16s rRNA γονιδίου αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση των βακτηρίων στο τυρόπηγμα και στο τυρί, χωρίς να υπάρχουν οι περιορισμοί των μεθόδων που εξαρτώνται από τις καλλιέργειες και των βιοχημικών αναλύσεων (Rasolofa et al., 2010). Η δυνατότητα ταυτοποίησης των βακτηριακών πληθυσμών σε ένα πολύπλοκο οικοσύστημα, είναι μεγάλης σημασίας τόσο για την κατανόηση της διαδικασίας μεταβολής των βακτηρίων, όσο και για τη μελέτη των μηχανισμών αλλοίωσης των τροφίμων, ή ακόμα και για την εξέταση της δυναμικής των βακτηρίων σε ένα προϊόν που ζυμώνεται (Alegria et al., 2009; Belén Flórez and Mayo, 2006; Bonetta et al., 2008; Casalta et al., 2009; Coppola et al., 2001; Dolci et al., 2008; Ercolini et al., 2003; Gala et al., 2008; Randazzo et al., 2006).

3.2.2 Εκτίμηση αποτυπώματος πολύπλοκων βακτηριακών κοινοτήτων

Οι Justé και συν. (2008), Jany and Barbier (2008), Pogačić και συν. (2010a), και Randazzo και συν. (2009) εφάρμοσαν μεθόδους εκτίμησης αποτυπώματος όπως για παράδειγμα DGGE, TGGE, SSCP, TRFLP, και ARISA ώστε να αναπαράγουν το σύνολο του πληθυσμού των βακτηρίων που υπάρχει σε δείγματα τυριών τόσο στο τελικό προϊόν όσο και κατά την παραγωγική διαδικασία. Η μέθοδος PCR-DGGE έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην μικροβιολογία τροφίμων, και η ποικιλία και η δυναμική των βακτηρίων κατά τη διαδικασία παραγωγής και ωρίμανσης, έχει μελετηθεί μέσω των απομονώσεων του DNA. Η μέθοδος Reverse transcription (RT)-PCR-DGGE έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των ειδών των βακτηρίων που είναι μεταβολικά ενεργά στα δείγματα τυριών, ενώ ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποίησαν τη μέθοδο αυτή προκειμένου να μελετήσουν τους πληθυσμούς των βακτηρίων σε προϊόντα με Προστατευμένη ονομασία Προέλευσης, όπως για παράδειγμα στο τυρί Castelmagno (Dolci et al., 2010), στη φέτα (Rantsiou et al., 2008), όπως και στο τυρί Ragusano (Randazzo et al., 2002).

Επίσης, ο Dolci και συν. (2013) μελέτησε το πληθυσμό των βακτηρίων στην επιφάνεια του τυριού ΠΟΠ Fontina, με τη χρησιμοποίηση τόσο του DNA όσο και του RNA. Η χρήση του rRNA έδωσε μια πιο λεπτομερή εικόνα των βακτηρίων και εντοπίστηκαν και βακτήρια που δεν είχαν εντοπισθεί με την ανάλυση του DNA. Άλλοι φυλογενετικοί δείκτες, όπως για παράδειγμα η β-υπομονάδα του γονιδίου της RNA πολυμεράσης (rpoB) μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά του 16S rRNA γονιδίου και να αντιμετωπισθούν τα μειονεκτήματα των δεικτών των ριβοσωματικών γονιδίων που αναφέρονται στην μεταξύ των ειδών ετερογένεια και τα πολλαπλά αντίγραφα (Rantsiou et al., 2004 ;Martin-Platero et al., 2009).

Η μέθοδος Single-strand conformation polymorphism (SSCP) είναι παρόμοια με την PCR-D/TGGE μιας και επιτρέπει τον διαχωρισμό των τμημάτων του DNA που έχουν το ίδιο μήκος, και μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση διαχωρισμός των PCR προϊόντων. (Πίνακας 3; Callon et al., 2006; Delbes et al., 2007; Delbes and Montel, 2005; Duthoit et al., 2003; Feurer et al., 2004b; Mounier et al., 2009, Saubusse et al., 2007). Οι κύριοι στόχοι της SSCP είναι η V2 και η V3 περιοχή του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων και το 18S (Callon et al., 2006) ή το 26/28S rDNA γονίδιο των ζυμών (Feurer et al., 2004a). Η μέθοδος T-RFLP βρίσκει ευρεία εφαρμογή λόγω της απλής εφαρμογής της και της αξιοπιστίας της για τα 16S rRNA γονίδια των βακτηρίων (Sánchez et al., 2006; Schütte et al., 2008).

3.3 In situ μέθοδοι

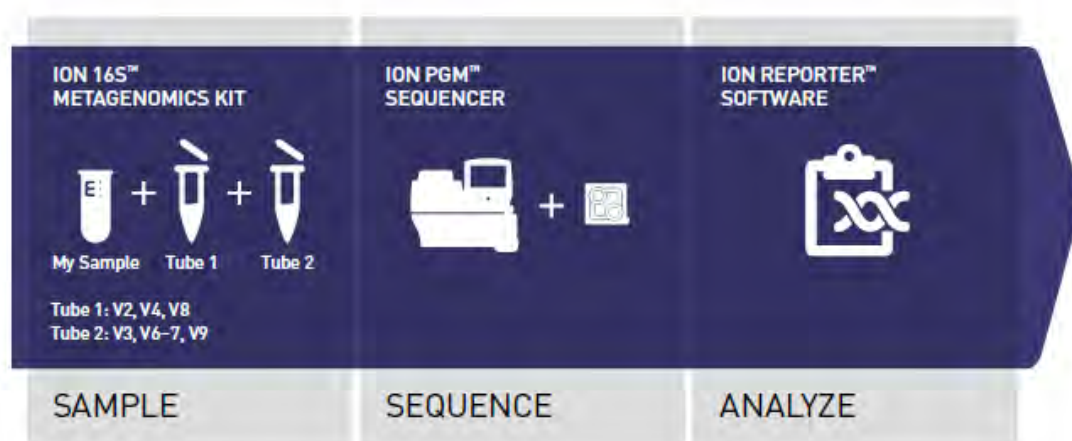
Η μέθοδος ανοσοφθορισμού in situ υβριδισμός (FISH) βασίζεται σε ολιγονουκλεοτιδικούς ιχνηθέτες που είναι σημασμένοι με φθορισμό και στοχεύουν ειδικές αλληλουχίες DNA. Εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού των ιχνηθετών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα, η μέθοδος FISH δεν μπορεί να βρει εφαρμογή στο προφίλ των βακτηρίων. Το ενδιαφέρον με τη μέθοδο αυτή είναι ότι επιτρέπει την παρατήρηση των κυττάρων στόχων μέσα στο φυσικό τους περιβάλλον. Ο Mounier και συν. (2009) μελέτησαν με τη μέθοδο αυτή την παρουσία στο τυρί Livarot των ζυμών *Candida catenulata*, *Candida intermedia*, *Geotrichum* spp., και *Yarrowia lipolytica*. Η ανίχνευση και ο εντοπισμός των ζυμών αυτών έγινε απευθείας στο τυρί. Επίσης ο Ercolini και συν. (2003) σχεδίασε probes ολιγονουκλεοτιδίων σημασμένα με φθορισμό για την ανίχνευση του *Lact. lactis*, *Lb. plantarum*, και *Leuconostoc mesenteroides* στο τυρί Stilton.

3.4 Αλληλούχιση του 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA)

Η κατανόηση της ποικιλότητας των βακτηριακών πληθυσμών, σχεδόν σε κάθε περιβάλλον, έχει διευκολυνθεί σημαντικά με την τεχνολογία της επόμενης γενεάς αλληλούχισης που σχετίζεται με την βιοπληροφορική. Η αλληλούχιση του 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA) είναι μια γρήγορη, οικονομική μέθοδος μελέτης του προφίλ των βακτηρίων και στηρίζεται στην ποικιλομορφία του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων. Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένου τον χαρακτηρισμό των βακτηριακών πληθυσμών, την ταξινομική ανάλυση και την ταυτοποίηση των ειδών (ThermoFisher SCIENTIFIC, Ion Torrent, 2014).

Η χρήση του 16S rRNA στην ταυτοποίηση των βακτηρίων, είναι ιδιαίτερα σημαντική σε βακτήρια με ασυνήθιστο φαινοτυπικό προφίλ, σε σπάνια βακτήρια, σε βακτήρια που αναπτύσσονται αργά, σε βακτήρια που δεν είναι δυνατόν να καλλιεργηθούν και σε

περιπτώσεις μολύνσεων που δεν μπορεί να καλλιεργηθεί ο παθογόνος παράγοντας. Το 16S rRNA γονίδιο των βακτηρίων αποτελείται από εννέα «υπερμεταβλητές περιοχές» (V1-V9), οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν στον χαρακτηρισμό των ειδών. Αυτές οι περιοχές περιβάλλονται από ιδιαίτερα συντηρημένες αλληλουχίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την δέσμευση των εκκινητών (Parikh et al., 2015). Η Ion Torrent πλατφόρμα επιτρέπει την ταυτοποίηση των ειδών των βακτηρίων με την αλληλούχιση του 16S rRNA. Το Ion 16S™ Metagenomics Kit είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να ενισχύει με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης τις υπερμεταβλητές περιοχές του 16S γονιδίου των βακτηρίων (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Διάγραμμα ροής της αλληλούχισης του 16S rRNA από το σύστημα Ion PGM και ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βιβλιοθήκη Ion Reporter™ Software.

Η γρήγορη και με ακρίβεια ταυτοποίηση των ειδών των βακτηρίων είναι ζωτικής σημασίας στην κλινική μικροβιολογία. Προκειμένου να ταυτοποιηθεί σε ένα δείγμα ένα προκαρυωτικό είδος, είναι συχνά αναγκαίο να καλλιεργηθεί το δείγμα για μέρες ή ώρες ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των βακτηρίων. Όλη αυτή η διαδικασία απαιτεί χρόνο και δεν είναι πάντα εφικτή και αποτελεσματική. Το Ion 16S™ Metagenomics Kit προσφέρει τα εργαλεία ώστε να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα. Για παράδειγμα, έχει χρησιμοποιηθεί για το χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση των βακτηριακών πληθυσμών σε μια πληθώρα δειγμάτων του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένου δείγματα από τη στοματική κοιλότητα (Junemann et al., 2012; Dassi et al., 2014), την αναπνευστική οδό (Blainey et al., 2012; Salipante et al., 2013a), το διαβητικό μυκήτωμα (Salipante et al., 2013b), το μηκόνιο (Ardisson et al., 2014), τα χέρια των εργαζομένων σε επαγγέλματα υγείας (Rosenthal et al., 2014), τα εγκεφαλικά αποστήματα (Kommedal et al., 2014) και το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και των θαλάσσιων θηλαστικών (Petrof et al., 2013; Milani et al., 2013; Mir et al., 2013; Bel et al., 2014).

4. Σκοπός της εργασίας

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και αυξάνεται η χρήση του 16S rRNA στην ταυτοποίηση των βακτηρίων σε ένα μεγάλο εύρος δειγμάτων. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ποιοτική και ποσοτική ταυτοποίηση των βακτηρίων σε δείγματα τυριών που παρασκευάστηκαν με αγελαδινό γάλα, μέσω τεχνικών αλληλούχισης νέας γενιάς χωρίς να πραγματοποιηθεί καλλιέργεια των δειγμάτων.

5. Πειραματική πορεία - Μέθοδοι

5.1 Δείγματα

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν πέντε δείγματα τυριών αγελαδινής προέλευσης που αγοράστηκαν από προθήκες λιανικής πώλησης υπεραγορών. Όλα τα δείγματα ήταν συσκευασμένα και τα δείγματα ταυτοποιήθηκαν με τις επισημάνσεις που αναφέρονται στον Πίνακα 4.

Α/Α	ΕΙΔΟΣ ΤΥΡΙΟΥ	ΕΠΙΣΗΜΑΝΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
1	Λευκό τυρί	16S010S3_v1_019
2	Κασέρι	16S010S4_v1_020
3	Γραβιέρα	16S011S8_v1
4	Ημίσκληρο τυρί	16S011S9_v1
5	Σκληρό τυρί	16S011S10_v1

Πίνακας 4. Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία και οι επισημάνσεις που έφεραν

5.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση ολικού DNA από τα τυριά, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PureLink Genomic DNA Kit (Invitrogen), που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Παίρνουμε δείγμα 100 mg τυρί και το τοποθετούμε σε φιαλίδια eppendorf των 1,5ml.
2. Για την απομάκρυνση του λίπους από τα δείγματα τυριών προσθέτουμε 1000ml διαλύματος SSC 1X, το αναδεύουμε στο vortex και το φυγοκεντρούμε στις 10.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά. Απομακρύνουμε το λίπος από την επιφάνεια και το υγρό και κρατάμε μόνο το ίζημα.

Παρασκευή διαλύματος 1X SSC: Πρώτα παρασκευάζουμε διάλυμα 20X SSC. Σε φιάλη 1 λίτρου βάζουμε 800ml απιονισμένο νερό και προσθέτουμε 175,3 g NaCl

(3M) και 82.2 g κιτρικό νάτριο (300 mM). Στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH του διαλύματος σε 7 με 1M HCl και συμπληρώνουμε μέχρι το 1 λίτρο με απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια αραιώνουμε για να προκύψει διάλυμα 1X SSC (150mM NaCl, 15 mM trisodium citrate).

3. Προσθέτουμε 180 µl Genomic Digestion Buffer και 20 µl πρωτεΐνάση K. Αναδεύουμε σε vortex στις 2.500 στροφές μέχρι να διαλυθεί το ίζημα.
4. Επωάζουμε τα δείγματα στους 55° C για περίπου 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση.
5. Φυγοκεντρούμε τα δείγματα στις 13.000 στροφές για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο φιαλίδιο eppendorf των 2 ml.
6. Προσθέτουμε 20 µl RNase A και αναδεύουμε στο vortex.
7. Προσθέτουμε 200 µl Genomic Lysis Binding Buffer και αναδεύουμε στο vortex.
8. Προσθέτουμε 200 µl αιθανόλη 100% και αναδεύουμε στο vortex.
9. Μεταφέρουμε το μίγμα σε ειδικά eppendorf με στήλες διαχωρισμού.
10. Φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 1,5 λεπτό.
11. Αλλάζουμε τις στήλες σε καθαρό eppendorf και προσθέτουμε 450 µl Wash Buffer 1 και επαναλαμβάνουμε το βήμα 10.
12. Αδειάζουμε τα σωληνάρια eppendorf από το υγρό και προσθέτουμε 450 µl Wash buffer 2 και φυγοκεντρούμε στις 14.000 στροφές για 3,5 λεπτά.
13. Τοποθετούμε τη στήλη σε καθαρό eppendorf και προσθέτουμε 60 µl Elution Buffer.
14. Τέλος φυγοκεντρούμε, για 1,5 λεπτό στις 14.000 στροφές.
15. Απομακρύνουμε την στήλη και έχουμε έτοιμο το δείγμα του DNA.

Αποθηκεύουμε το απομονωμένο DNA στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.

5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης και φωτομέτρηση

Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης χρησιμοποιήθηκε μετά την απομόνωση του DNA, για να βεβαιωθεί ότι υπάρχει σε ικανοποιητική συγκέντρωση, χωρίς προσμίξεις, με την παρουσία μιας ευκρινούς ζώνης.

Για την τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0.1% w/v

TBE 1X Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

Αρχικά, παρασκευάζουμε διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt).

Για την προετοιμασία της πηκτής αгарόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή.
2. Προετοιμασία της πηκτής. Χρησιμοποιήθηκαν 0,5 g αгарόζης και 50 ml TAE 1x για την παρασκευή διαλύματος 1%.
3. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων. Κατά τη θέρμανση πρέπει να γίνεται συχνή ανάδευση του διαλύματος.
4. Το διάλυμα ανακινείται έως ότου κρυώσει.
5. Προστίθενται 2 μl SERVA DNA Stain.
6. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
7. Εισάγεται το ειδικό χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις “πηγάδια” στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
8. Όταν η πηκτή στερεοποιηθεί αφαιρείται το χτενάκι και η χαρτοταινία.
9. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1X μέχρι να καλυφτεί το πήκτωμα.
10. Τα δείγματα του DNA αναμειγνύονται με ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης. Στην περίπτωση του ελέγχου της απομόνωσης αναμειγνύουμε 3 μl loading buffer με 2 μl DNA.
11. Φόρτωση των δειγμάτων στα πηγάδια.

Κλείνουμε την συσκευή, τη συνδέουμε με το ρεύμα και ρυθμίζουμε την τάση στα 100V. Η ύπαρξη φυσαλίδων είναι ενδεικτικές της ροής του ρεύματος και το DNA μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Μετά από περίπου 30 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή. Το DNA καθίσταται ορατό με την προσθήκη στο πήκτωμα χρωστικής η οποία ενσωματώνεται στο DNA και μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία φθορίζει. Το όριο ανίχνευσης είναι περίπου 20 ng DNA. Για την οπτικοποίηση των τμημάτων του DNA στο πήκτωμα, το τελευταίο τοποθετείται σε τράπεζα λάμπας υπεριώδους στο 320 nm ή σε ειδική συσκευή απεικόνισης.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων μετά την απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε φωτομετρήσή τους στα 260 nm.

5.4 PCR και αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA

Η εκτίμηση της βακτηριακής ποικιλομορφίας, η ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών και η κατάταξη τους σε ταξινομικές ομάδες, είναι εφικτή λόγω της μεγάλης συντήρησης του γονιδίου 16S rRNA στα βακτήρια. Η ταξινομική ανάλυση είναι εφικτή λόγω της παρουσίας 9 υπερμεταβλητών περιοχών (V1-V9), όπου η διαφοροποίηση των αλληλουχιών τους, μας επιτρέπει την ταξινόμηση των μικροβίων. Επίσης, λόγω της ύπαρξης συντηρημένων περιοχών που πλαισιώνουν τις μεταβλητές, είναι δυνατή η ενίσχυση τους μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και τη χρήση παγκόσμιων εκκινητών.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής, είναι η ταυτόχρονη ανάλυση των 7 από τις 9 υπερμεταβλητές περιοχές του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων. Αυτό επιτυγχάνεται με τους εκκινητές της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι να στοχεύουν στο 80% των αλληλουχιών που βρίσκονται στη Greengenes βάση δεδομένων. Επίσης, η ευαισθησία ανίχνευσης της μεθόδου είναι 1:1000 για όλους τους βακτηριακούς πληθυσμούς των δειγμάτων, που είχαν 10^3 – 10^6 16S rDNA αντίγραφα γονιδίου ανά αντίδραση.

5.4.1 Ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου 16S rRNA με Multiplex PCR

Η Multiplex PCR πραγματοποιήθηκε με το Ion 16S™ Metagenomics Kit για την ενίσχυση τμημάτων του βακτηριακού 16S rRNA γονιδίου. Οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε η ενίσχυση των περιοχών 2, 4 και 8 να γίνεται σε μία αντίδραση, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα προϊόντα μεγέθους 250, 288 και 295 βάσεων αντίστοιχα. Σε μία δεύτερη αντίδραση ενισχύονται οι περιοχές 3, 6-7 και 9, έχοντας ως αποτέλεσμα προϊόντα μεγέθους 215, 260 και 209 βάσεων αντίστοιχα (Εικόνα 5). Τα σετ των παραπάνω εκκινητών είναι σχεδιασμένα να στοχεύουν >80% των αλληλουχιών της βάσης δεδομένων Greengenes με 100% ομοιότητα για τουλάχιστον ένα ζεύγος εκκινητών.



Εικόνα 5. Οι υπερμεταβλητές περιοχές του 16S rRNA γονιδίου της *E. coli* απεικονίζονται με τα πράσινα τετράγωνα. Οι περιοχές Amplicons V2, V4, και V8 στοχεύονται στο φιαλίδιο αντίδρασης 1 της multiplex PCR, ενώ οι περιοχές V3, V6-7, και V9 στοχεύονται στο φιαλίδιο αντίδρασης 2 της multiplex PCR.

5.4.2 Δημιουργία βιβλιοθηκών και αλληλούχιση

Τα PCR προϊόντα χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία βιβλιοθήκης με τη χρήση του Ion Plus Fragment Library Kit. Η σήμανση των δειγμάτων γίνεται μέσω του Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 Kit. Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται με το Ion OneTouch 2 System και το Ion PGM Template OT2 400 Kit. Η αλληλούχιση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Ion PGM Sequencing 400 Kit σε μηχάνημα Ion PGM χρησιμοποιώντας το Ion 316 Chip (ThermoFisher SCIENTIFIC, 2014).

5.4.3 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

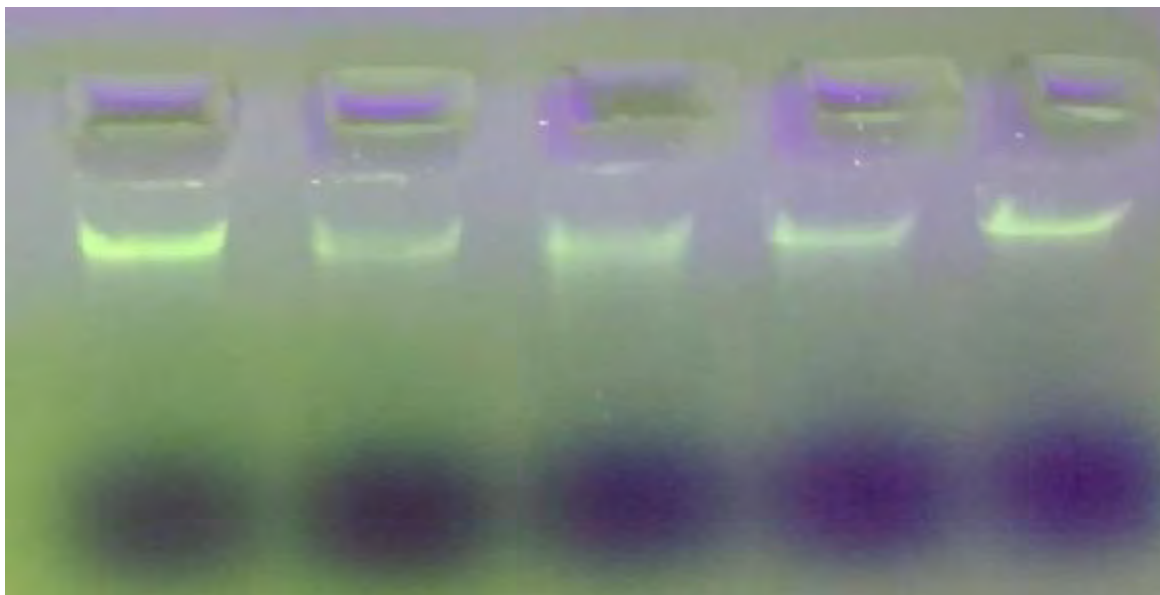
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του Torrent Suite Software και του Ion Reporter. Ως βάσεις δεδομένων αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι Curated MicroSEQ 16S Reference Library v2013.1 και Curated Greengenes v13.5. Για την ταξινομική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα διαβάσματα και από τους δύο εκκινητές ανά ζεύγος και στη συνέχεια οι ακολουθίες των εκκινητών απομακρύνθηκαν. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι αλληλουχίες που είχαν τουλάχιστον 90% αλληλεπικάλυψη μεταξύ της αλληλουχίας επερώτησης και της αλληλουχίας από τη βάση δεδομένων. Χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες οι οποίες είχαν τουλάχιστον δέκα αναγνώσεις. Το ποσοστό που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση γένους είναι 97% ομοιότητα και το ποσοστό για την ταυτοποίηση είδους 99% ομοιότητα. Στις περιπτώσεις όπου η διαφορά ομοιότητας ανάμεσα στις δύο πρώτες αλληλουχίες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα με την αλληλουχία επερώτησης είναι μικρότερη από 0.2%, χρησιμοποιείται ο όρος “slash ID”.

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του Krona (Ondov et al, 2011) και του πακέτου “Phyloseq” της R (McMurdie & Holmes, 2013).

6. Αποτελέσματα

6.1 Απομόνωση DNA

Η απομόνωση το DNA έγινε με την διαδικασία που έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο και ο έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην Εικόνα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης.



Εικόνα 6. Απομόνωση DNA από το δείγμα του λευκού τυριού, του κασεριού, της γραβιέρας, του ημίσκληρου τυριού και του σκληρού τυριού. Η τοποθέτηση των δειγμάτων έγινε με την προαναφερόμενη σειρά και με κατεύθυνση από αριστερά προς τα δεξιά.

Η ένταση της φωτεινότητας και το πάχος κάθε ζώνης αποτελούν ένδειξη της ποσότητας του DNA που απομονώθηκε. Η ποσότητα που απομονώθηκε κρίθηκε ικανοποιητική για όλα τα δείγματα, οπότε προχωρήσαμε στην PCR.

6.2 Αποτελέσματα φωτομέτρησης δειγμάτων

Με τη φωτομέτρηση των δειγμάτων μετά την απομόνωση του DNA στα 260 nm, πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA και λήφθηκαν οι τιμές που φαίνονται στον Πίνακα 6.

Είδος δείγματος	Απορρόφηση δείγματος
Λευκό τυρί	73
Κασέρι	69
Γραβιέρα	62
Ημίσκληρο τυρί	68
Σκληρό τυρί	70

Πίνακας 6. Οι τιμές που λήφθηκαν από τη φωτομέτρηση των δειγμάτων.

6.3 Αποτελέσματα PCR και αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA

Στον πίνακα 7 αναφέρονται το σύνολο των αλληλουχιών που προέκυψαν από την αλληλούχιση στα δείγματα που εξετάστηκαν.

Είδος δείγματος	Σύνολο αλληλουχιών	Αλληλουχίες που περάσαν τον ποιοτικό έλεγχο	Αλληλουχίες που αγνοήθηκαν	Αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν ανά δείγμα	Αλληλουχίες που δεν ταυτοποιήθηκαν ανά δείγμα
Λευκό τυρί	63080	37446	10951	26495	0
Κασέρι	59235	41146	20781	20365	0
Γραβιέρα	44232	27512	7795	19717	0
Ημίσκληρο τυρί	42638	29970	6800	23170	0
Σκληρό τυρί	53860	34752	9285	25467	0

Πίνακας 7. Το σύνολο αλληλουχιών που προέκυψαν από την αλληλούχιση ανά δείγμα.

Σε κάθε δείγμα εξετάστηκαν οι ακόλουθες υπερμεταβλητές περιοχές V2, V3, V4, V6-7, V8, και V9 και στους πίνακες (Πίνακες 8-12) που ακολουθούν φαίνονται αλληλουχίες που προέκυψαν ανα υπερμεταβλητή περιοχή.

Υπερμεταβλητή περιοχή	Αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν	Αλληλουχίες που περάσαν τον ποιοτικό έλεγχο	Αλληλουχίες χαμηλής συχνότητας	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή
V2	1989	3110	1121	1931	1304	1304	2902	1806	1806
V3	7289	10022	2733	9442	6294	6294	8954	3728	3728
V4	4336	6389	2053	6633	5123	5123	4893	1266	1266
V6-7	4579	6356	1777	3869	2633	2633	4857	3723	3723
V8	8174	11372	3198	8840	6329	6329	7088	5043	5043
V9	128	197	69	148	116	116	146	81	81

Πίνακας 8. Δείγμα λευκού τυριού, Το σύνολο των αλληλουχιών που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε υπερμεταβλητή περιοχή.

Υπερμεταβλητή περιοχή	Αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν	Αλληλουχίες που περάσαν τον ποιοτικό έλεγχο	Αλληλουχίες χαμηλής συχνότητας	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή
V2	2138	5625	3487	3183	2378	2378	4703	3247	3247
V3	4130	8057	3927	7083	4272	4272	5363	3785	3785
V4	5648	10969	5321	8837	6680	6680	5907	4289	4289
V6-7	1054	2943	1889	2186	1653	1653	1611	1290	1290
V8	7176	13203	6027	9223	7124	7124	8362	6079	6079
V9	219	349	130	219	196	196	209	153	153

Πίνακας 9. Δείγμα κασεριού, Το σύνολο των αλληλουχιών που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε υπερμεταβλητή περιοχή.

Υπερμεταβλητή περιοχή	Αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν	Αλληλουχίες που περάσαν τον ποιοτικό έλεγχο	Αλληλουχίες χαμηλής συχνότητας	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή
V2	502	968	466	740	517	517	1451	451	451
V3	7353	9844	2491	8445	6526	6526	9281	3318	3318
V4	2777	4021	1244	3618	3181	3181	2199	840	840
V6-7	4554	6496	1942	3471	2717	2717	5344	3779	3779
V8	4396	5940	1544	3835	3060	3060	3722	2880	2880
V9	135	243	108	203	187	187	91	56	56

Πίνακας 10. Δείγμα Γραβιέρας, Το σύνολο των αλληλουχιών που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε υπερμεταβλητή περιοχή.

Υπερμεταβλητή περιοχή	Αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν	Αλληλουχίες που περάσαν τον ποιοτικό έλεγχο	Αλληλουχίες χαμηλής συχνότητας	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή
V2	782	1177	395	686	479	479	1313	698	698
V3	9434	11780	2346	7749	6074	6074	8245	5706	5706
V4	2022	2709	687	2873	2607	2607	1965	102	102
V6-7	5716	7398	1682	3829	3061	3061	5308	4337	4337
V8	5183	6808	1625	4541	3550	3550	4076	3258	3258
V9	33	98	65	88	67	67	44	31	31

Πίνακας 11. Δείγμα Ημίσκληρου τυριού, Το σύνολο των αλληλουχιών που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε υπερμεταβλητή περιοχή.

Υπερμεταβλητή περιοχή	Αλληλουχίες που ταυτοποιήθηκαν	Αλληλουχίες που περάσαν τον ποιοτικό έλεγχο	Αλληλουχίες χαμηλής συχνότητας	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών εμπρόσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή	Αριθμός αλληλουχιών οπίσθιου πλήρους μεγέθους	Αριθμός έγκυρων αλληλουχιών οπίσθιου εκκινητή
V2	1413	2205	792	1324	894	894	2214	1311	1311
V3	6647	8806	2159	7892	6052	6052	7649	2754	2754
V4	4019	5674	1655	5053	4280	4280	3614	1394	1394
V6-7	4442	6166	1724	3480	2635	2635	4539	3531	3531
V8	8514	11334	2820	7816	6051	6051	6701	5283	5283
V9	432	567	135	417	385	385	262	182	182

Πίνακας 12. Δείγμα σκληρού τυριού, Το σύνολο των αλληλουχιών που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε υπερμεταβλητή περιοχή.

6.4 Αποτελέσματα αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA και ταυτοποίησης των βακτηρίων ανά οικογένειας, γένος και είδος

Προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση του είδους του βακτηρίου θα έπρεπε οι αλληλουχίες να έφεραν ποσοστό 99% ομοιότητας με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα ορισμένα γένη βακτηρίων να μην είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν σε επίπεδο είδους, όπως επίσης και ορισμένες αλληλουχίες ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο οικογένειας χωρίς να είναι δυνατό να ταυτοποιηθούν σε επίπεδο γένους και είδους βακτηρίου.

Στον Πίνακα 13 αναφέρονται οι αλληλουχίες των δειγμάτων που εξετάστηκαν και αναλύθηκαν στο σημείο ώστε να γίνει ταυτοποίηση του είδους των βακτηρίων.

Είδος βακτηρίου	Λευκό τυρί	Κασέρι	Γραβιέρα	Ημίσκληρο τυρί	Σκληρό τυρί
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	52	0	0	0
<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	0	0	0	0	14
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	0	525	0	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0	100	0	0	0
<i>Acinetobacter soli</i>	0	83	0	0	0
<i>Acinetobacter ursingii</i>	0	221	0	0	0
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	0	20	0	0	0
<i>Chryseobacterium anthropi</i>	0	13	0	0	0
<i>Chryseobacterium haifense</i>	0	61	55	0	12
<i>Corynebacterium freneyi</i>	0	11	0	0	0
<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	0	0	69	0	46
<i>Finegoldia magna</i>	0	22	0	0	0
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	0	435	0	0	0
<i>Helcococcus ovis</i>	0	96	0	0	0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	16	0	0	0	40
<i>Lactobacillus curvatus</i>	174	0	0	0	0
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	0	0	0	12	10
<i>Lactobacillus graminis</i>	86	0	0	0	0
<i>Lactobacillus helveticus</i>	902	0	2409	0	1962
<i>Lactobacillus paracasei</i>	185	0	0	170	0
<i>Lactobacillus sakei</i>	103	0	0	0	0
<i>Lactobacillus zeae</i>	48	0	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i>	331	10	0	698	0
<i>Lactococcus piscium</i>	0	0	166	0	635
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	0	0	0	39	0
<i>Methylobacterium goesingense</i>	0	110	0	0	0
<i>Methylobacterium jeotgali</i>	0	906	0	0	0
<i>Methylobacterium persicinum</i>	0	126	0	0	0
<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	0	102	0	0	0
<i>Moraxella osloensis</i>	0	0	0	0	10
<i>Novosphingobium nitrogenifigens</i>	0	28	0	0	0
<i>Pasteurella multocida</i>	0	27	0	0	0
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	0	0	0	13	0
<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i>	0	714	0	0	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	119	0	0	0
<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	86	2098	0	0	0
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	0	11	0	0	0
<i>Psychrobacter lutiphocae</i>	0	23	0	0	0
<i>Psychrobacter sanguinis</i>	0	17	0	0	0
<i>Sphingomonas echinoides</i>	0	93	0	0	0
<i>Sphingomonas mali</i>	0	20	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	0	0	0	0
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	10	0	0	0
<i>Streptococcus cristatus</i>	0	20	0	0	0
<i>Streptococcus merionis</i>	0	72	0	0	0
<i>Streptococcus minor</i>	0	25	0	0	0
<i>Streptococcus suis</i>	0	44	0	0	0
<i>Streptococcus thermophilus</i>	13838	0	8742	13896	12709
<i>Streptococcus uberis</i>	0	27	12	0	32
<i>Tessaracoccus oleiagri</i>	0	15	0	0	0
<i>Thauera</i> sp.	0	22	0	0	0
<i>Thermus thermophilus</i>	0	0	36	0	0

Πίνακας 13. Τα είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα που εξετάσθηκε.

Ενώ, στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακες 14 και 15) αναφέρονται οι αλληλουχίες των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν σε επίπεδο οικογένειας και γένους βακτηρίων αντίστοιχα, και δεν ήταν δυνατό να γίνει περαιτέρω ταυτοποίηση του είδους των βακτηρίων.

Οικογένεια βακτηρίου	Λευκό τυρί	Κασέρι	Γραβιέρα	Ημίσκληρο τυρί	Σκληρό τυρί
uncassified Carnobacteriaceae	0	10	0	0	0
uncassified Enterobacteriaceae	81	125	0	11	0
uncassified Sphingomonadaceae	0	45	0	0	0
unclassified Bacteroidaceae	0	10	0	0	0
unclassified Bacillaceae	0	11	0	0	0
unclassified Bradyrhizobiaceae	0	48	0	0	0
unclassified Clostridiaceae	0	43	0	0	0
unclassified Lactobacillaceae	41	0	111	0	130
unclassified Micrococcaceae	0	45	0	0	0
unclassified Moraxellaceae	0	227	0	0	23
unclassified Nostocaceae	0	13	0	0	0
unclassified Peptostreptococcaceae	0	12	0	0	0
unclassified Phyllobacteriaceae	0	1594	0	0	0
unclassified Planococcaceae	0	24	0	0	0
unclassified Pseudomonadaceae	360	988	303	0	103
unclassified Pseudonocardiaceae	0	35	0	0	0
unclassified Rhizobiaceae	0	848	0	0	0
unclassified Ruminococcaceae	0	18	0	0	0
unclassified Streptococcaceae	219	0	157	146	166
unclassified Xanthomonadaceae	276	5462	0	0	0

Πίνακας 14. Οι οικογένειες βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα που εξετάστηκε.

Γένος βακτηρίου	Λευκό τυρί	Κασέρι	Γραβιέρα	Ημίσκληρο τυρί	Σκληρό τυρί
unclassified Bradyrhizobium	0	12	0	0	0
unclassified Acinetobacter	58	1106	66	22	386
unclassified Arthrobacter	0	155	0	0	0
unclassified Atopostipes	0	10	0	0	0
unclassified Azoarcus	0	10	0	0	0
unclassified Bacillus	0	63	0	0	0
unclassified Bifidobacterium	0	27	0	0	0
unclassified Caryophanon	0	28	0	0	0
unclassified Chryseobacterium	0	0	95	0	0
unclassified Clostridium	0	11	0	0	0
unclassified Corynebacterium	0	51	0	0	0
unclassified Lactobacillus	3360	114	4279	459	5102
unclassified Lactococcus	586	12	38	386	208
unclassified Leuconostoc	0	0	0	12	26
unclassified Methylobacterium	0	488	0	0	0
unclassified Methyloferula	0	15	0	0	0
unclassified Methylovirgula	0	12	0	0	0
unclassified Paracoccus	0	11	0	0	0
unclassified Parvimonas	0	11	0	0	0
unclassified Pasteurella	0	18	0	0	0
unclassified Phyllobacterium	0	1423	0	0	0
unclassified Psychrobacter	0	23	0	0	0
unclassified Rhizobium	0	260	0	0	0
unclassified Rhodococcus	0	77	0	0	0
unclassified Rhodovastum	0	11	0	0	0
unclassified Sphingomonas	0	121	0	0	0
unclassified Staphylococcus	55	12	0	0	0
unclassified Streptococcus	5680	362	3179	7306	3853
unclassified Thauera	0	71	0	0	0
unclassified Vibrio	0	15	0	0	0

Πίνακας 15. Τα γένη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα που εξετάσθηκε.

6.4.1 Αποτελέσματα του δείγματος λευκού τυριού

Από το γενετικό υλικό του δείγματος του λευκού τυριού, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του γένους *Streptococcus* σε ποσοστό 73% (Εικόνα 7) και σε ποσοστό 52% ταυτοποιήθηκε το είδος *Streptococcus thermophilus*. Το γένος *Lactobacillus* απομονώθηκε σε ποσοστό 23% και από αυτό το 3% ταυτοποιήθηκε ως *Lactobacillus helveticus* ενώ σε πολύ μικρότερα ποσοστά ταυτοποιήθηκαν τα ακόλουθα είδη λακτοβακίλλων: *Lactobacillus crispatus* (0,06%), *Lactobacillus curvatus* (0,66%), *Lactobacillus graminis* (0,33%), *Lactobacillus paracasei* (0,7%), *Lactobacillus sakei* (0,4%), *Lactobacillus zeae* (0,19%) *Lactobacillus lactis* και (1,25%). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του είδους *Pseudomonas hibiscicola* (0,33%) και του είδους *Staphylococcus epidermidis* (0,04%).



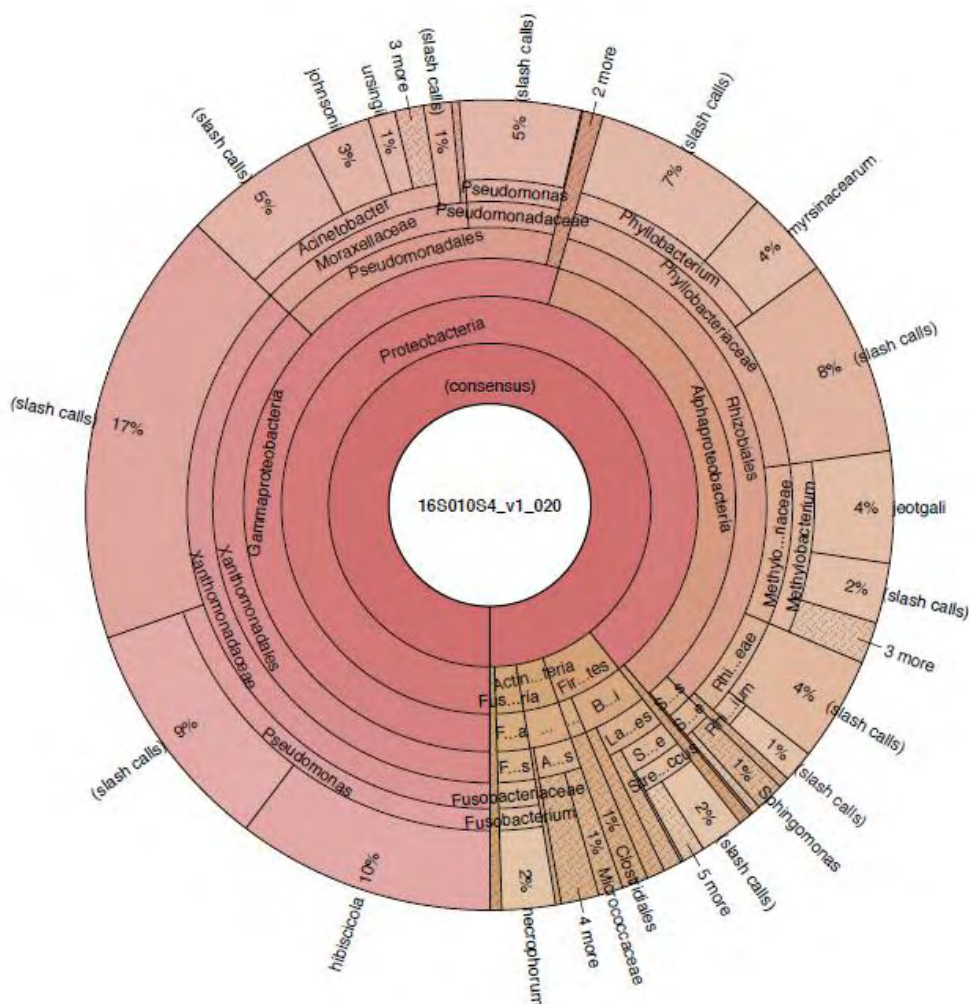
Εικόνα 7. Γραφική απεικόνιση των οικογενειών, γενών και ειδών βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στο δείγμα του λευκού τυριού.

6.4.2 Αποτελέσματα του δείγματος κασεριού

Από το δείγμα του κασεριού απομονώθηκε μια πληθώρα αλληλουχιών βακτηρίων (Εικόνα 8). Αναλυτικότερα, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του γένους *Acinetobacter* σε ποσοστό 12%, ενώ τα είδη *Acinetobacter johnsonii* και *Acinetobacter ursingii* ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες τους σε ποσοστά 3% και 1% αντίστοιχα. Σε μικρότερα ποσοστά ταυτοποιήθηκαν τα είδη *Acinetobacter baumannii* (0,25%), *Acinetobacter lwoffii* (0,5%) και *Acinetobacter soli* (0,4%). Για το γένος *Phyllobacterium* ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του σε ποσοστό 11% και συγκεκριμένα το είδος *Phyllobacterium myrsinacearum* σε ποσοστό 4%. Επίσης, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του γένους *Methylobacterium* σε ποσοστό 9%, καθώς ειδικότερα ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες των ειδών *Methylobacterium jeotgali* (4%), *Methylobacterium goesingense* (0,5%), *Methylobacterium persicinum* (0,6%) και *Methylobacterium radiotolerans* (0,5%). Αλληλουχίες του γένους *Streptococcus* ταυτοποιήθηκαν σε ποσοστό 7% και σε συνολικό ποσοστό 5% ταυτοποιήθηκαν τα ακόλουθα

είδη: *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus merionis*, *Streptococcus minor*, *Streptococcus suis* και *Streptococcus uberis*. Για το γένος *Pseudomonas* ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του σε ποσοστό 19% και συγκεκριμένα το είδος *Pseudomonas hibiscicola* σε ποσοστό 10%.

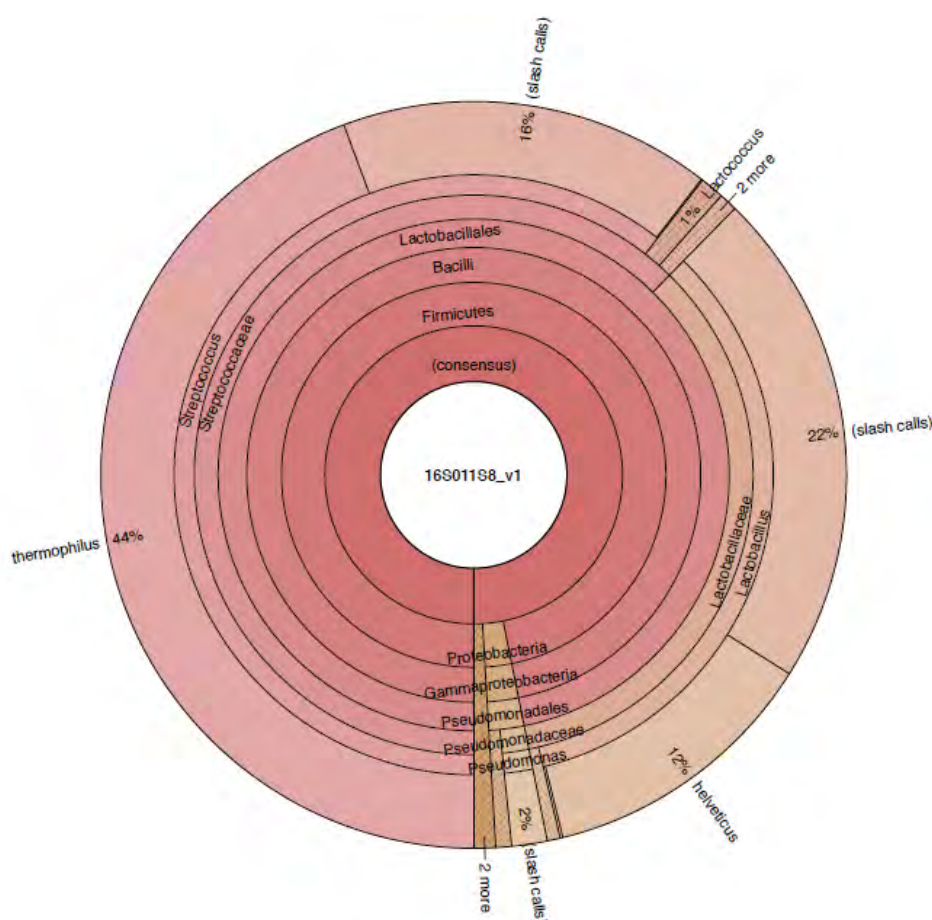
Όσο αφορά τα υπόλοιπα είδη για τα οποία ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες, αξίζει να σημειωθεί ότι το είδος *Fusobacterium necrophorum* ταυτοποιήθηκε σε ποσοστό 2% και σε πολύ μικρότερα ποσοστά τα ακόλουθα είδη: *Bifidobacterium pseudolongum* (0,1%), *Chryseobacterium anthropi* (0,06%), *Chryseobacterium haifense* (0,3%), *Corynebacterium freneyi* (0,05%), *Fingoldia magna* (0,1%), *Helcococcus ovis* (0,5%), *Lactococcus lactis* (0,05%), *Novosphingobium nitrogenifigens* (0,14%), *Pasteurella multocida* (0,13%), *Propionibacterium acnes* (0,6%), *Psychrobacter lutiphocae* (0,11%), *Psychrobacter sanguinis* (0,09%), *Sphingomonas echinoids* (0,45%), *Sphingomonas mali* (0,1%), *Staphylococcus hominis* (0,05%) και *Tessaracoccus oleigari* (0,1%).



Εικόνα 8. Γραφική απεικόνιση των οικογενειών, γενών και ειδών βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στο δείγμα του κασεριού.

6.4.3 Αποτελέσματα του δείγματος γραβιέρας

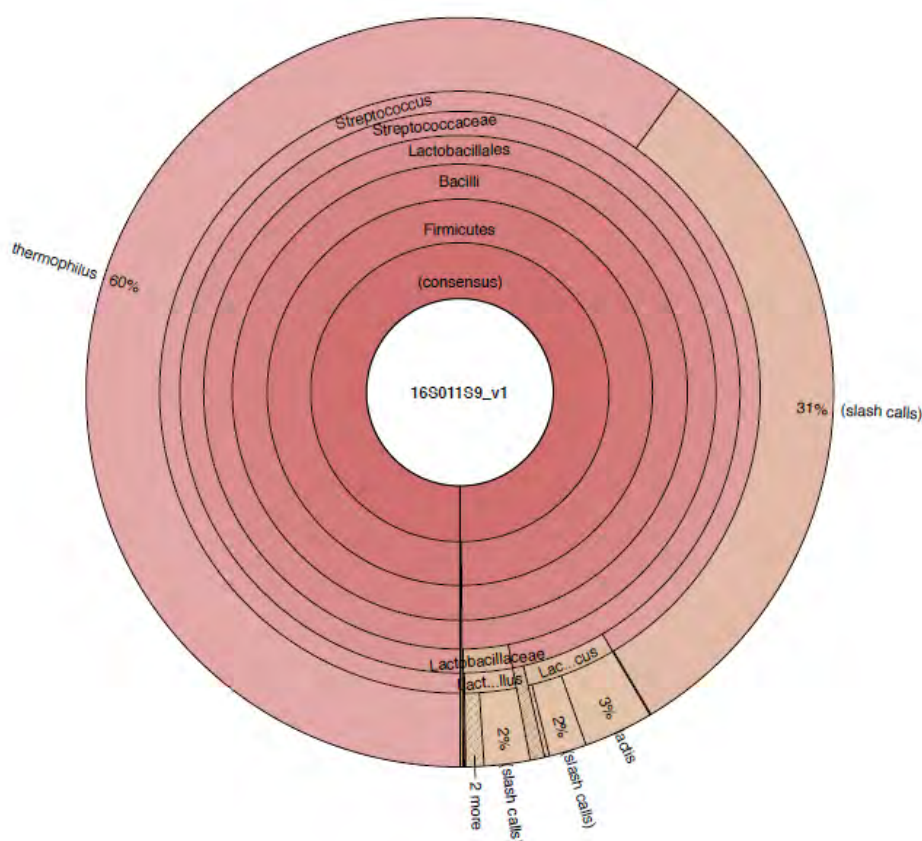
Από το γενετικό υλικό του δείγματος γραβιέρα, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες (Εικόνα 9) του γένους *Streptococcus* σε ποσοστό 60% και σε ποσοστό 44% ταυτοποιήθηκε το είδος *Streptococcus thermophilus*, ενώ σε ποσοστό 0,06% το είδος *Streptococcus uberis*. Το γένος *Lactobacillus* απομονώθηκε σε ποσοστό 34% και από αυτό το 12% ταυτοποιήθηκε ως *Lactobacillus helveticus*. Σε ποσοστό 3% ταυτοποιήθηκε το γένος *Lactococcus* και από αυτό ταυτοποιήθηκε το είδος *Lactococcus piscium* (0,84%). Τέλος, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του είδους *Chryseobacterium haifense* (0,28%), του είδους *Enhydrobacter aerosaccus* (0,35%) και του είδους *Thermus thermophilus* (0,18%).



Εικόνα 9. Γραφική απεικόνιση των οικογενειών, γενών και ειδών βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στο δείγμα της γραβιέρας.

6.4.4 Αποτελέσματα του δείγματος ημίσκληρου τυριού

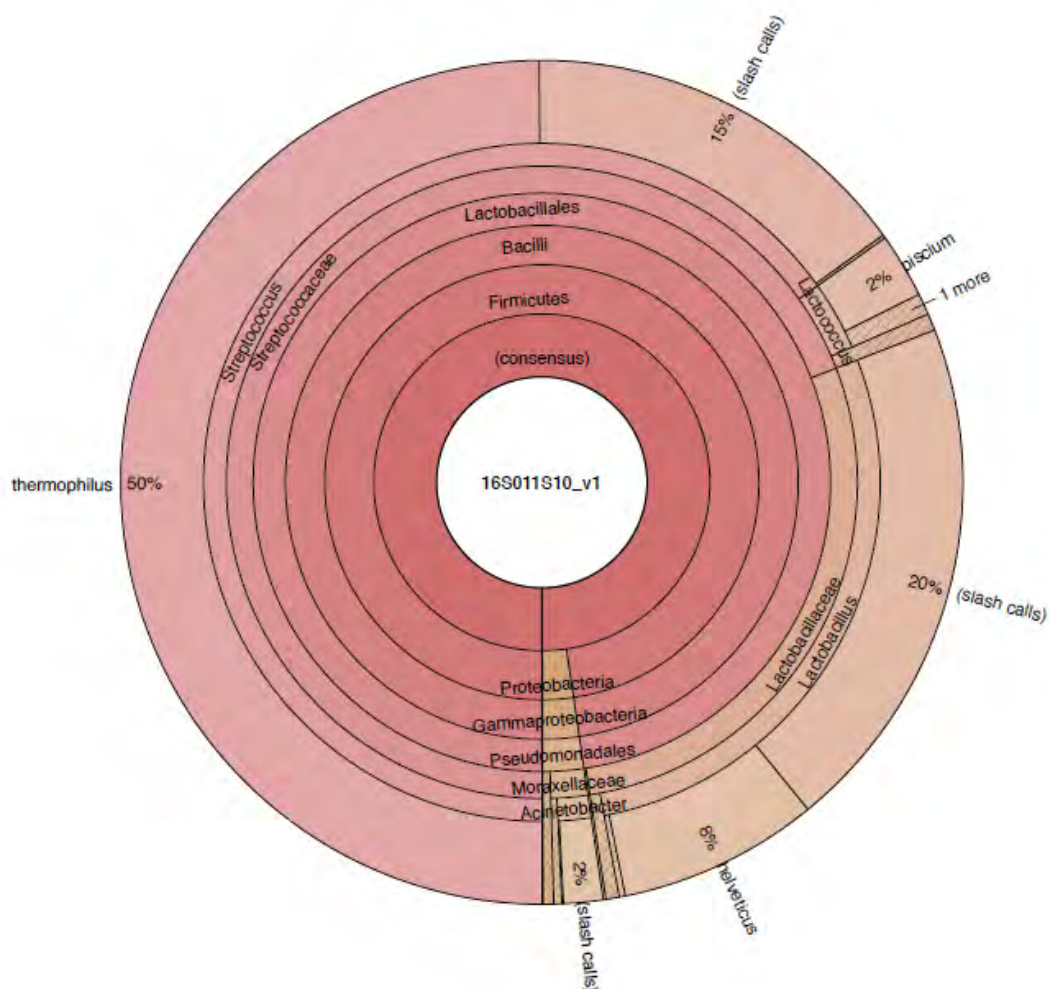
Στο δείγμα του ημίσκληρου τυριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες των γενών *Streptococcus*, *Lactobacillus* και *Lactococcus* σε ποσοστά 91%, 4% και 5% αντίστοιχα (Εικόνα 10). Από το γένος *Streptococcus* ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του είδους *Streptococcus thermophilus* σε ποσοστό 60%. Αναφορικά με το γένος *Lactobacillus*, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες των ειδών *Lactobacillus paracasei* (0,7%) και *Lactobacillus delbrueckii* (0,05%), ενώ για το γένος *Lactococcus* ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες των ειδών *Lactococcus piscium* (3%) και *Lactococcus raffinolactis* (0,17%). Επίσης, ανιχνεύθηκαν σε πολύ μικρό ποσοστό αλληλουχίες του είδους *Pediococcus pentosaceus* (0,05%).



Εικόνα 10. Γραφική απεικόνιση των οικογενειών, γενών και ειδών βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στο δείγμα του ημίσκληρου τυριού.

6.4.5 Αποτελέσματα του δείγματος σκληρού τυριού

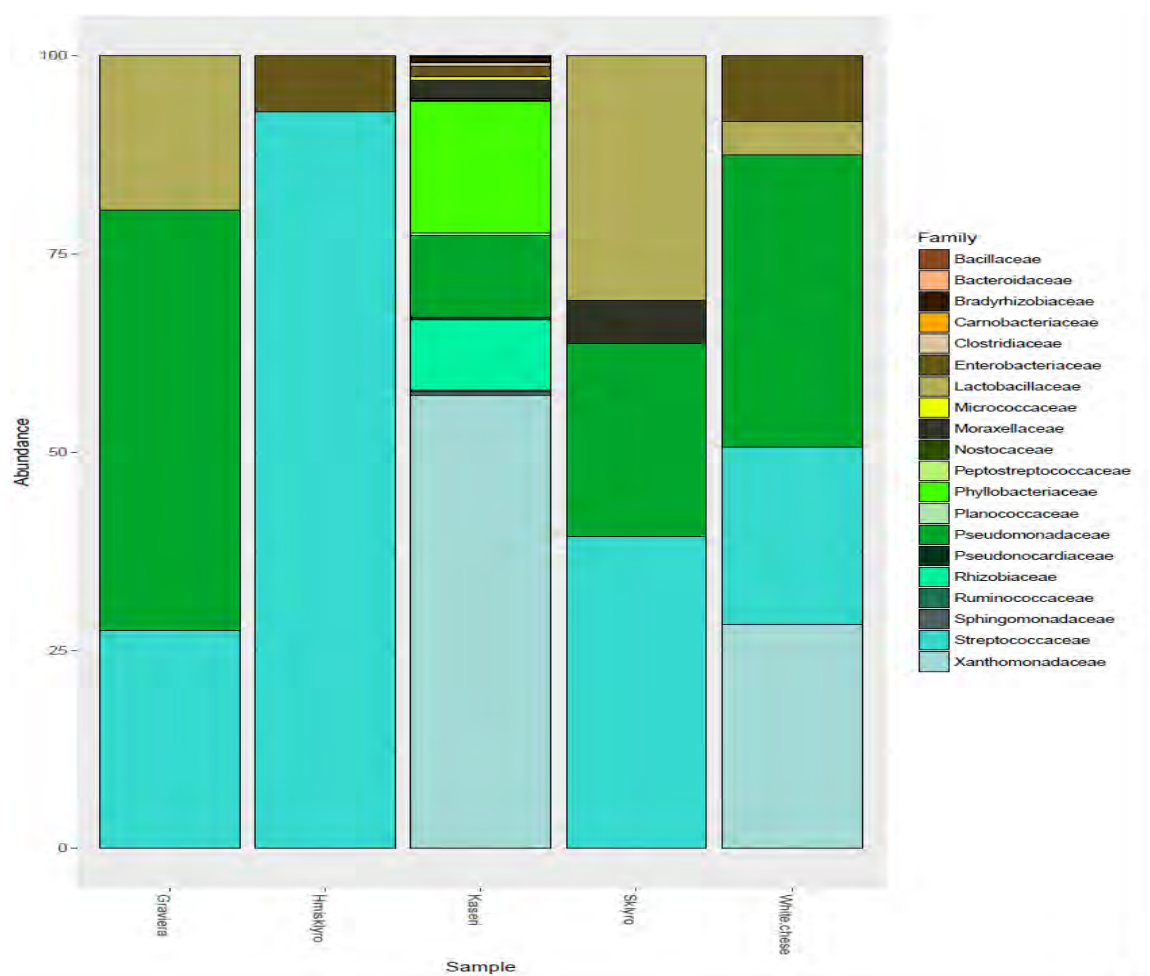
Από το γενετικό υλικό του δείγματος σκληρού τυριού, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του γένους *Streptococcus* σε ποσοστό 65% και σε ποσοστό 50% ταυτοποιήθηκε το είδος *Streptococcus thermophilus*, ενώ σε ποσοστό 0,13% το είδος *Streptococcus uberis* (Εικόνα 11). Το γένος *Lactobacillus* απομονώθηκε σε ποσοστό 28% και από αυτό το 8% ταυτοποιήθηκε ως *Lactobacillus helveticus*, καθώς επίσης ταυτοποιήθηκαν τα είδη *Lactobacillus crispatus* (0,16%) και *Lactobacillus delbrueckii* (0,04%). Σε ποσοστό 3% ταυτοποιήθηκε το γένος *Lactococcus* και συγκεκριμένα ταυτοποιήθηκε το είδος *Lactococcus piscium* (2%) και του είδους *Acinetobacter gyllenbergii* (0,06%), του είδους *Enhydrobacter aerosaccus* (0,18%), του είδους *Chryseobacterium haifense* (0,05%) και του είδους *Moraxella osloensis* (0,04%).



Εικόνα 11. Γραφική απεικόνιση των οικογενειών, γένων και ειδών βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στο δείγμα του σκληρού τυριού.

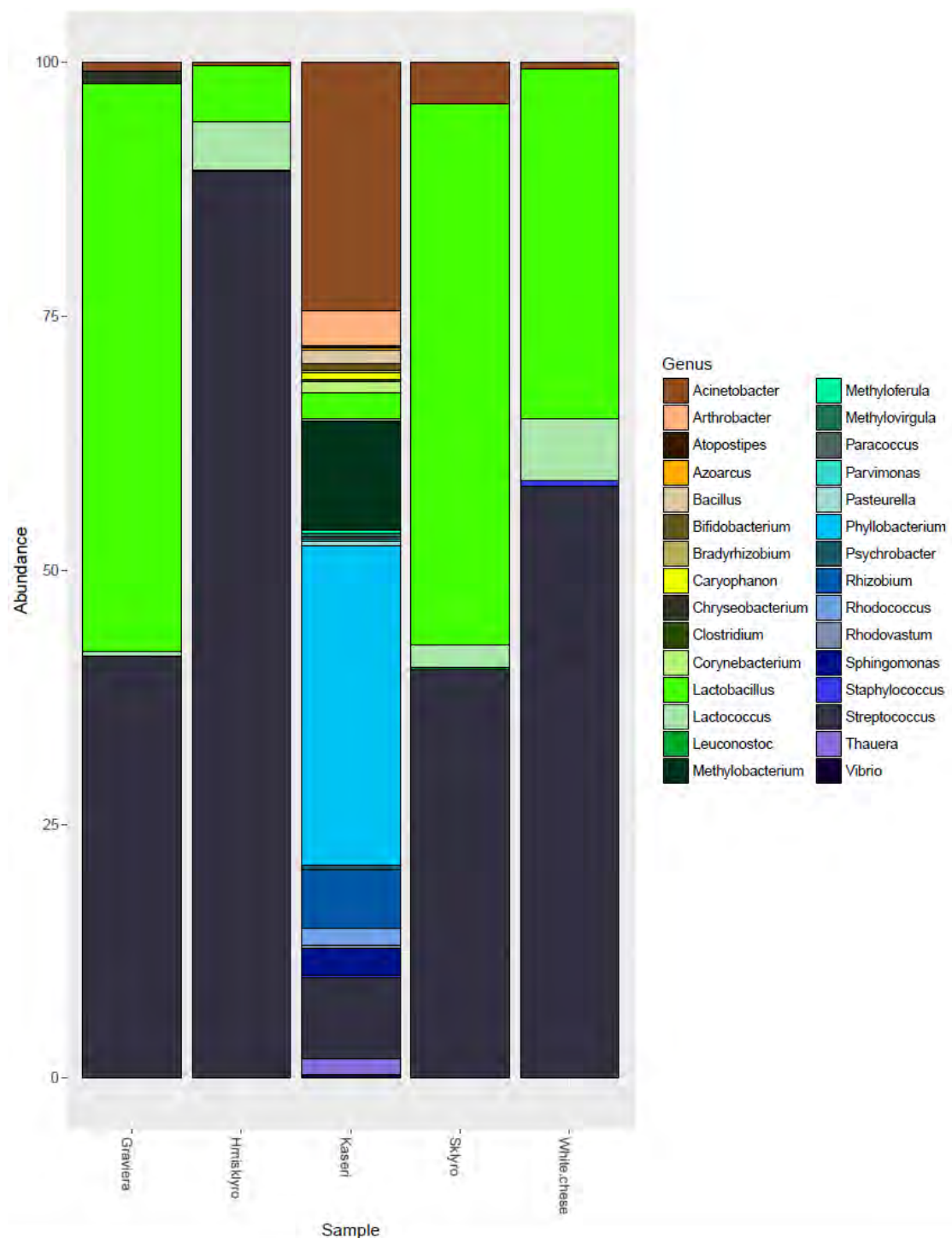
6.4.6 Συγκριτικά αποτελέσματα των δειγμάτων

Στις γραφικές απεικονίσεις που ακολουθούν απεικονίζονται οι οικογένειες, τα γένη και τα είδη των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν. Η γραφική απεικόνιση των οικογένειων των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν (Εικόνα 12), καταδεικνύει ότι στο δείγμα του ημίσκληρου τυριού ταυτοποιήθηκαν δύο οικογένειες βακτηρίων (*Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*), στο δείγμα της γραβιέρας ταυτοποιήθηκαν τρεις οικογένειες βακτηρίων (*Lactobacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Streptococcaceae*), στο δείγμα του σκληρού τυριού τέσσερις οικογένειες βακτηρίων (*Lactobacillaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Streptococcaceae*), στο δείγμα του λευκού τυριού πέντε οικογένειες βακτηρίων (*Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Streptococcaceae*, *Xanthomonadaceae*), ενώ στο δείγμα του κασεριού ταυτοποιήθηκαν δεκαοχτώ οικογένειες βακτηρίων (*Carnobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Bacteroidaceae*, *Bacillaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Clostridiaceae*, *Micrococcaceae*, *Moraxellaceae*, *Nostocaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Planococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Rhizobiaceae*, *Ruminococcaceae*, *Xanthomonadaceae*).



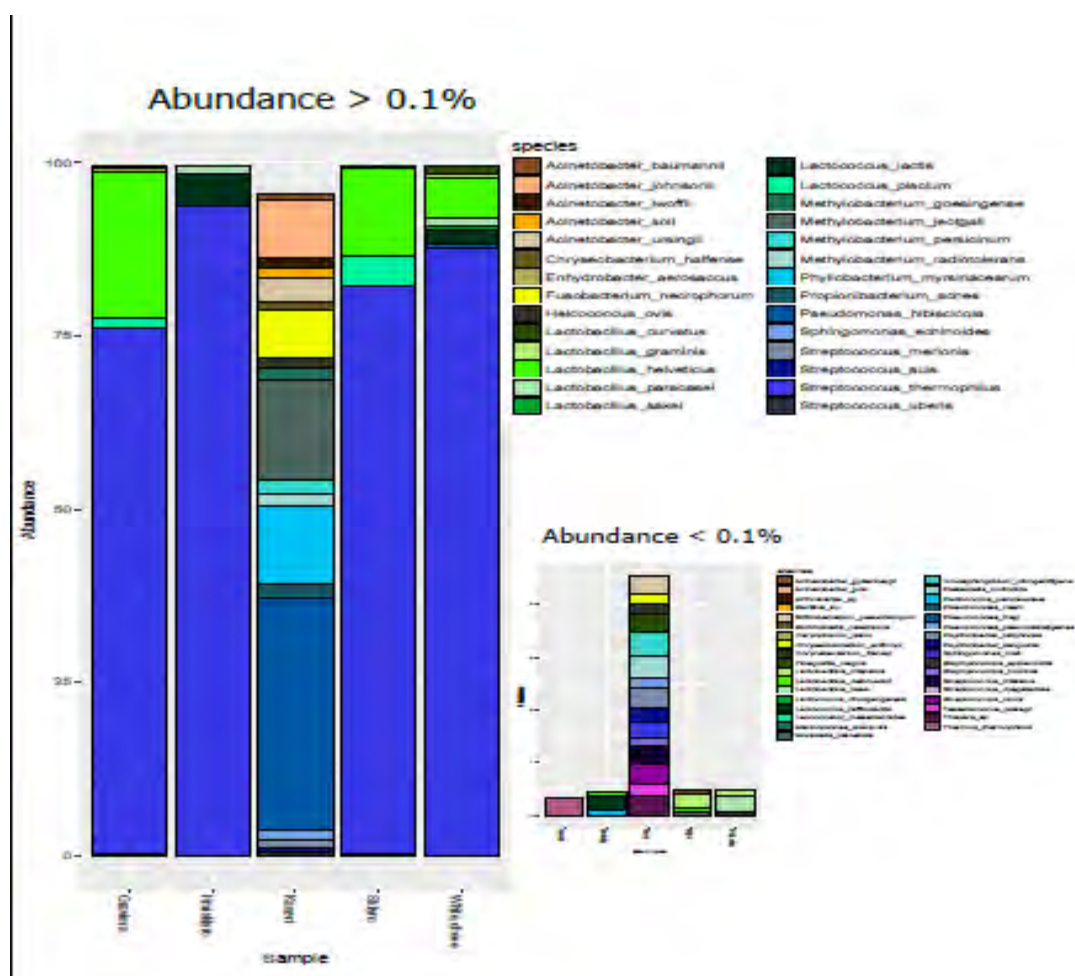
Εικόνα 12. Γραφική απεικόνιση των οικογενειών των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα.

Αναφορικά με τα γένη των βακτηρίων στα δείγματα του λευκού τυριού, της γραβιέρας, του ημίσκληρου και του σκληρού τυριού ταυτοποιήθηκαν πέντε γένη βακτηρίων, ενώ στο δείγμα του κασεριού ταυτοποιήθηκαν εικοσιοχτώ διαφορετικά γένη βακτηρίων. Τα γένη *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Streptococcus* ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Γραφική απεικόνιση των γενών των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα.

Στο γραφική απεικόνιση που ακολουθεί (Εικόνα 14), καταγράφονται τα είδη των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στα δείγματα των τυριών που εξετάστηκαν, και είναι εμφανές ότι στο δείγμα του κασεριού ταυτοποιήθηκαν τα περισσότερα είδη βακτηρίων. Πιο αναλυτικά, στο δείγμα του λευκού τυριού ταυτοποιήθηκαν έντεκα είδη βακτηρίων, στο δείγμα της γραβιέρας επτά είδη βακτηρίων, στο δείγμα του ημίσκληρου τυριού έξι είδη βακτηρίων, στο δείγμα του σκληρού τυριού εννέα είδη βακτηρίων, και τέλος στο δείγμα του κασεριού τριαντά πέντε είδη βακτηρίων.



Εικόνα 14. Γραφική απεικόνιση των ειδών των βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν σε όλα τα δείγματα.

7. Συζήτηση

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η μικροβιακή χλωρίδα των τυριών εξαρτάται από παράγοντες που επηρεάζουν τόσο την ανάπτυξη και όσο και την επιβίωση των βακτηρίων. Τέτοιοι παράγοντες είναι η μικροβιακή χλωρίδα του νωπού γάλακτος, η διαδικασία ωρίμανσης του τυριού καθώς και οι συνθήκες συντήρησης του (Beresford et al., 2001; Beresford and Williams, 2004; Irlinger and Mounier, 2009). Η μικροβιακή χλωρίδα μπορεί να περιέχει μικροοργανισμούς, οι οποίοι ακόμα και μετά την παστερίωση είναι δυνατόν να παίζουν ρόλο στη φθορά και στη μακροζωία του προϊόντος, όπως για παράδειγμα τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas* και του γένους *Acinetobacter* (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007). Επίσης, η μικροβιακή χλωρίδα του νωπού γάλακτος μπορεί να περιέχει βακτήρια που ευθύνονται για την εμφάνιση ποικίλων ασθενειών στα ζώα, συμπεριλαμβανομένου και τις μαστίτιδες, οι οποίες επηρεάζουν τόσο την κλινική εικόνα του ζώου όσο και την γαλακτοπαραγωγική του ικανότητα. Ενώ, θα πρέπει να σημειώνεται ότι η μικροβιακή χλωρίδα, περιέχει και βακτήρια που προσδίδουν στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως ιδιαίτερη γεύση, υφή και οσμή. Τα είδη των βακτηρίων που έχουν σχετιστεί κατά περίπτωση με επιθυμητά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν είδη των γενών *Lactobacillus*, *Streptococcus* και *Lactococcus* (Coppola et al., 2008; Ashraf and Shah, 2011; Alemayehu et al., 2014).

Αναφορικά με τα βακτήρια που συμμετέχουν ενεργά στην παραγωγή του τυριού, ο Fox και συν (2000) περιέγραψαν τρεις κατηγορίες βακτηρίων της μικροβιακής χλωρίδας των τυριών: τα βακτήρια της καλλιέργειας εκκίνησης, τα βακτήρια της δευτερεύουσας καλλιέργειας και τα γαλακτικά βακτήρια που δεν συμμετέχουν στην καλλιέργεια εκκίνησης. Τα βακτήρια της καλλιέργειας εκκίνησης συμμετέχουν στην παραγωγή οξέων κατά την παρασκευή του τυριού και συμμετέχουν, επίσης, σε ποικίλο βαθμό στη διαδικασία ωρίμανσης σε συνδυασμό με τα βακτήρια της δευτερεύουσας καλλιέργειας. Τα γαλακτικά βακτήρια που δεν συμμετέχουν στην καλλιέργεια εκκίνησης, οι ζύμες και οι μύκητες που προέρχονται από το γάλα ή από το περιβάλλον παραγωγής των τυριών διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια παραγωγής των τυριών.

Τα βακτήρια της καλλιέργειας εκκίνησης προσφέρουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά μέσω μιας ελεγχόμενης και προβλεπόμενης ζύμωσης. Η πρωταρχική λειτουργία των βακτηρίων της καλλιέργειας εκκίνησης είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος από τη λακτόζη και έπειτα η πρωτεολυτική και λιπολυτική δραστηριότητα, η απόδοση γεύσης και αρώματος στο τυρί, και η παρεμπόδιση ανάπτυξης ανεπιθύμητων βακτηρίων. Οι καλλιέργειες εκκίνησης χαρακτηρίζονται ως μεσόφιλες και περιέχουν βακτήρια όπως για παράδειγμα: *Lactococcus*

lactis subsp. *cremoris*, *L. delbrueckii* subsp. *Lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, ή θερμόφιλες και περιέχουν βακτήρια όπως για παράδειγμα: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S.thermophilus*), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. plantarum*.

Στη συγκεκριμένη εργασία στο γενετικό υλικό που απομονώθηκε από τα δείγματά μας ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες των ακόλουθων βακτηρίων των καλλιιεργειών εκκίνησης: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus zeae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus raffinolactis*, *Streptococcus thermophilus*. Τα ποσοστά ταυτοποίησης των παραπάνω βακτηρίων ποικίλανε από δείγμα σε δείγμα. Το βακτήριο *Streptococcus thermophilus* ταυτοποιήθηκε σε όλα τα δείγματα και σε ποσοστό 44%-60%, με εξαίρεση το δείγμα του κασεριού στο οποίο δεν εντοπίστηκαν αλληλουχίες του παραπάνω βακτηρίου. Στο δείγμα του λευκού τυριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες αρκετών ειδών λακτοβακίλλων και ένα είδος λακτοκόκκου (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus graminis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus zeae*, *Lactococcus lactis*), ενώ στο δείγμα του κασεριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες μόνο του είδους *Lactococcus lactis*. Επίσης, στο δείγμα της γραβιέρας ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του *Lactobacillus helveticus* και *Lactococcus piscium*, στο δείγμα του ημίσκληρου τυριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis* και στο δείγμα του σκληρού τυριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* και *Lactococcus piscium*. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στο δείγμα της γραβιέρας ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες και του βακτηρίου *Thermus thermophilus*. Η διαφορά αυτή, στα είδη των λακτοβακίλλων και λακτοκόκκων στα δείγματα που εξετάστηκαν, είναι πιθανόν να οφείλεται στα διαφορετικά είδη των καλλιιεργειών εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή των τυριών όπως και στο τρόπο παρασκευής τους. Είναι γνωστό ότι οι διάφορες τεχνολογικές λεπτομέρειες της παρασκευής και ωριμάνσεως των τυριών, καθορίζουν το είδος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται και δρουν σε κάθε στάδιο παρασκευής και εκείνων που επιβιώνουν και δρουν στα ώριμα τυριά (Λιτοπούλου-Τζανετάκη, 1989).

Από όσο γνωρίζουμε δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, μελέτη ταυτοποίησης της μικροβιακής χλωρίδας τυριών αγελαδινής προέλευσης ελληνικής παρασκευής, ούτε με μοριακές τεχνικές αλλά ούτε και με τις «κλασσικές» μικροβιολογικές μεθόδους καλλιέργειας

και βιοχημικής ταυτοποίησης βακτηρίων. Αντίθετα, για τα ελληνικά παραδοσιακά τυριά που παράγονται από αιγοπρόβειο γάλα, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες της μικροβιακής τους χλωρίδας και με τη χρήση ποικίλων τεχνικών.

Αξίζει να αναφέρουμε την μελέτη του Σάμελη και συν. (2010) οι οποίοι μελέτησαν δείγματα «παραδοσιακής» γραβιέρας με αιγοπρόβειο γάλα, πέντε εβδομάδες μετά την ωρίμανση, τόσο με μικροβιολογικές τεχνικές καλλιέργειας βακτηρίων όσο και με μοριακές μεθόδους (Samelis et al, 2011), και διαπίστωσαν ότι στη μικροβιακή χλωρίδα κυριαρχούσαν οι μεσοφιλικόι λακτοβάκιλλοι *Lactobacillus casei/paracasei* (67.5%) και *Lactobacillus plantarum* (16.3%), οι οποίοι δεν συμπεριλαμβάνονταν στις αρχικές καλλιέργειες βακτηρίων. Αντίθετα τα βακτήρια *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* και *Leuconostoc sp.* που περιλαμβάνονταν στις αρχικές καλλιέργειες βακτηρίων απομονώθηκαν σε συχνότητες 3.8%, 0.6% and 1.9%, αντίστοιχα. Στη δική μας εργασία, στο δείγμα γραβιέρας αγελαδινής προέλευσης ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του *Lactobacillus helveticus* (12%), *Lactococcus piscium* (0,85%), *Streptococcus thermophilus* (44%) και *Thermus thermophilus* (0,18%). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφέρουμε ότι για κανένα δείγμα μας δεν ήταν γνωστό ποια βακτήρια περιέχονταν στην καλλιέργεια εκκίνησης με αποτέλεσμα να μην ήμασταν σε θέση να μελετήσουμε πώς μεταβλήθηκαν τα βακτήρια των καλλιιεργειών εκκίνησης που χρησιμοποιήθηκαν.

Επίσης, στο δείγμα του ημίσκληρου τυριού ταυτοποιήθηκαν αλληλούχιες του βακτηρίου *Pediococcus pentosaceus*, ο οποίος είναι κόκκος και συμπεριλαμβάνεται στα γαλακτικά βακτήρια διότι το προϊόν του μεταβολισμού του είναι το γαλακτικό οξύ (Pritchard and Coolbear, 1993). Στη βιομηχανία τροφίμων θεωρείται ένα σημαντικό βακτήριο των καλλιιεργειών εκκίνησης εξαιτίας της ικανότητάς του να ζυμώνει τρόφιμα, όπως για παράδειγμα διάφορα είδη κρέατος, φυτών και τυριών (Hu et al., 2006).

Παράλληλα, εκτός από τα βακτήρια των καλλιιεργειών εκκίνησης ταυτοποιήθηκαν και αλληλουχίες βακτηρίων που προκαλούν αλλοιώσεις στα γαλακτομικά προϊόντα. Έτσι, στα δείγματα του κασεριού και του λευκού τυριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του βακτηρίου *Pseudomonas hibiscicola* σε ποσοστά 10% και 0,33% αντίστοιχα. Γενικά, το βακτήριο της ψευδομονάδας απομονώνεται από το περιβάλλον, φυτά και ιστούς ζώων, ενώ αρκετά είδη του είναι υπεύθυνα για την αλλοίωση του γάλακτος ακόμα και μετά τη διαδικασία της παστερίωσης του. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ψυχотρόπο με αποτέλεσμα να μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες ψύξης και να μειώνει το χρόνο ζωής των γαλακτομικών προϊόντων (Dogan and Boor, 2003).

Στα δείγματα του κασεριού, του σκληρού τυριού και της γραβιέρας ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες βακτηρίων του γένους *Chryseobacterium*. Ορισμένα είδη του γένους

Chryseobacterium είναι παθογόνα στον άνθρωπο και στα ζώα (Bernardet et al., 2002, 2005, 2006), ενώ ορισμένα στελέχη ανήκουν στην κατηγορία των βακτηρίων, τα οποία είναι ψυχοτρόπα με πρωτεολυτική δράση, και προκαλούν μια ποικιλία αλλοιώσεων στα προϊόντα τροφίμων, όπως για παράδειγμα σε κατεργασμένο κρέας, κατεψυγμένα ψάρια και όστρακα, και γαλακτοκομικά προϊόντα (Gonzalez et al., 2000; Hugo et al., 1999, 2003).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η σύσταση της μικροβιακής χλωρίδας των γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελεί ένα ευμετάβλητο σύστημα, το οποίο επηρεάζεται ποικιλοτρόπως σε όλη την διάρκεια παραγωγής και επεξεργασίας του προϊόντος. Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη μικροβιακή χλωρίδα σχετίζονται με την υγεία του ζώου και το μικροβιακό φορτίο του περιβάλλοντος στο οποίο διαβίει το ζώο. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι η μικροβιακή χλωρίδα μπορεί να επηρεαστεί από τις συνθήκες σταβλισμού, από το κατά πόσο το ζώο βρίσκεται σε κλειστό ή ανοιχτό χώρο, από τη χορήγηση αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση ή την πρόληψη ασθενειών, από την εποχικότητα της λήψης του γάλακτος και τη γεωγραφική θέση των εγκαταστάσεων (Vacheyrou et al., 2011; Bokulich et al., 2013; Doyle et al., 2017). Επίσης, έχει καταδειχτεί ότι το μικροβιακό φορτίο επηρεάζεται από τις συνθήκες και τον εξοπλισμό κατά την συλλογή, αποθήκευση και μεταφορά του προϊόντος (Bokulich et al., 2013; Kable et al., 2016).

Η ανάλυση των δειγμάτων τυριών της δικής μας εργασίας έδειξε την ύπαρξη αρκετών αλληλουχιών βακτηρίων που εντοπίζονται στο περιβάλλον και σε ποικίλες επιφάνειες και αντικείμενα των κτηνοτροφικών εγκαταστάσεων. Συγκεκριμένα, στο δείγμα του κασεριού και του σκληρού τυριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες βακτηρίων του γένους *Acinetobacter*, το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο στη φύση, μιας και μπορεί να απομονωθεί από το έδαφος, τις επιφάνειες και τα δείγματα νερού (Baumann et al., 1968), ενώ επίσης είναι ευκαιριακά παθογόνο στον άνθρωπο σε διάφορες νοσοκομειακές λοιμώξεις και η επικυνδινότητα του αυξάνεται λόγω της αύξησης της βακτηριακής αντοχής έναντι των αντιβιοτικών (Fournier et al., 2006; Cerqueira and Peleg, 2011; Howard et al., 2012).

Επίσης, στο δείγμα του κασεριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του βακτηρίου *Bifidobacterium pseudolongum*. Το γένος *Bifidobacterium* αντιπροσωπεύει μια από τις πιο σημαντικές ομάδες βακτηρίων στα κόπρανα των ζώων και του ανθρώπου (Tap et al., 2009; Uyeno et al., 2010) και συγκεκριμένα το *Bifidobacterium pseudolongum* έχει ταυτοποιηθεί σε πάνω από το 80% του συνόλου των μπιφιδοβακτηρίων που εντοπίστηκαν σε δείγματα κοπράνων από διάφορα ζώα, και τα περισσότερα είχαν συλλεχθεί από βοοειδή και χοίρους (Gavini et al., 2006). Αρκετές μελέτες χρησιμοποίησαν τα μπιφιδοβακτήρια ως μέσο προσδιορισμού της επιμόλυνσης των επιφανειακών νερών από κόπρανα (Nebra et al., 2003; Bonjoch et al., 2005; King et al., 2007), όπως επίσης προτάθηκε ως δείκτης επιμόλυνσης με

κόπρανα του νωπού γάλακτος και των τυριών που παρασκευάζονται με νωπό γάλα (Delcenserie et al., 2005). Πράγματι, το *Bifidobacterium pseudolongum* ήταν το είδος που απομονώθηκε με μεγαλύτερη συχνότητα σε δείγματα νωπού γάλακτος από κτηνοτροφικές εγκαταστάσεις και είχαν επιμολυνθεί με κόπρανα βοοειδών (Beerens et al., 2000; Delcenserie et al., 2011).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι στο δείγμα του κασεριού ταυτοποιήθηκαν επιπλέον αλληλουχίες ειδών βακτηρίων που εντοπίζονται στο περιβάλλον. Αναλυτικότερα, ανιχνεύθηκαν αλληλουχίες του *Corynebacterium freneyi*, το οποίο είναι ευρέως διαδεδομένο στη φυσιολογική μικροβιακή χλωρίδα των ζώων, όπως επίσης και του ανθρώπου και είναι παθογόνο (Collins, 2004). Επιπρόσθετα, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του βακτηρίου *Finegoldia magna*, το οποίο ανήκει στη φυσιολογική χλωρίδα του γαστρεντερικού και ουρογεννητικού συστήματος ζωικών οργανισμών (Rosenthal, 2012), του βακτηρίου *Novosphingobium nitrogenifigens*, το οποίο είναι φυσιολογικός ξενιστής του εδάφους, των ιζημάτων και των υδρόβιων περιβάλλοντων (Addison et al., 2007) και τέλος αλληλουχίες του γένους *Methylobacterium*. Από το τελευταίο, ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα είδη *Methylobacterium persicinum*, το οποίο έχει απομονωθεί σε δείγματα νερού σε εργοστάσιο παραγωγής τροφίμων στην Ιαπωνία (Kato et al., 2008) και το *Methylobacterium jeotgali*, το οποίο απομονώθηκε στην Κορέα από θαλασσινά που είχαν υποστεί ζύμωση (Aslam et al., 2007; Lai et al., 2011).

Επιπλέον, στο προαναφερόμενο δείγμα ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του βακτηρίου *Staphylococcus hominis*, ενώ στο δείγμα του λευκού τυριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του *Staphylococcus epidermidis*. Γενικά, οι σταφυλόκοκκοι συγκαταλέγονται στα βακτήρια που «φυσιολογικά αποικίζουν» το δέρμα και τους βλεννογόνους του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών (Kloos, 1986) και ειδικότερα ο *Staphylococcus epidermidis* επιμολύνει συχνά τα δείγματα που αποστέλλονται για εργαστηριακή ανάλυση (Queck and Otto, 2008; Otto, 2009). Τέλος, στο δείγμα του σκληρού τυριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του βακτηρίου *Moraxella osloensis*, το οποίο συνυπάρχει μαζί με τα νηματώδη παράσιτα *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Ruisheng et al., 2008), και τα δύο τελευταία μαζί προκαλούν μικτή μόλυνση στα σαλιγκάρια του εδαφούς και οδηγούν στο θανατό τους (Tan and Grewal, 2001).

Όπως έχει ήδη προαναφερθεί, από την καλλιέργεια του νωπού γάλακτος μπορούν να απομονωθούν και να ταυτοποιηθούν βακτήρια που ευθύνονται για την πρόκληση συγκεκριμένων ασθενειών στα ζώα, βοοειδή ή αιγοπρόβατα. Έτσι, και στη δική μας εργασία και με τη μέθοδο που χρησιμοποιήσαμε ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες βακτηρίων που

προκαλούν νοσήματα στα βοοειδή, και οι περισσότερες αλληλουχίες εντοπίστηκαν στο δείγμα του κασεριού.

Αναλυτικότερα, ταυτοποιήθηκαν αλληλούχίες του βακτηρίου *Fusobacterium necrophorum* το οποίο «φυσιολογικά» υπάρχει στο περιβάλλον που διαβιών τα βοοειδή, μιας και υπάρχει στο περιεχόμενο της μεγάλης κοιλίας, του εντέρου και των κοπράνων των βοοειδών (Kanoë et al., 1975). Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να πολλαπλασιασθεί ανεξέλεγκτα και να προκαλέσει νεκρωτικές αλλοιώσεις σε διάφορα όργανα, όπως για παράδειγμα στη μεγάλη κοιλία, στο ήπαρ (Tadepalli et al., 2009), και κυρίως είναι υπεύθυνο για την πρόκληση ποδοδερματίδας, μια σημαντική φλεγμονή των κάτω άκρων (Tulasne and Béguin, 1982), η οποία συνδέεται με μείωση της γαλακτοπαραγωγής.

Επιπρόσθετα, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του βακτηρίου *Helcococcus onis*. Αρχικά, το βακτήριο αυτό απομονώθηκε από αποστήματα του πνεύμονα, του ήπατος και του σπλήνα προβάτων, όπως επίσης και σε περίπτωση υποκλινικής μαστίτιδας προβάτων (Collins et al., 1999). Πρόσφατα, έχει απομονωθεί από αποστήματα πνεύμονα βοοειδών και ήταν υπεύθυνο για την πρόκληση βαλβιδικής ενδοκαρδίτιδας βοοειδών, γεγονός που καταδεικνύει ότι μπορεί να αποτελέσει αιτιολογικό παράγοντα διάφορων νοσημάτων σε ποικίλα είδη ζώων και των βοοειδών (Post et al., 2003; Kubota and Morimoto, 2006; Morimoto et al., 2006; Kutzer et al., 2008).

Στο δείγμα του κασεριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες και του βακτηρίου *Pasteurella multocida*, το οποίο είναι έντονα παθογόνο βακτήριο για αρκετά είδη ζώων, προσβάλλει κυρίως το αναπνευστικό σύστημα και προκαλεί σημαντικές οικονομικές απώλειες (Confer, 1993; Radostits et al., 2007). Έχει, όμως, απομονωθεί στο γάλα βοοειδών που παρουσίαζαν τόσο υποκλινική όσο και κλινική μαστίτιδα (Asfour et al., 2016) καθώς και σε περιπτώσεις βοοειδών που παρουσίαζαν μαστίτιδα και θήλαζαν μόσχους (Ribeiro et al., 2010).

Παράλληλα, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του βακτηρίου *Propionibacterium acnes* το οποίο εντοπίζεται στο δέρμα του ανθρώπου, στη στοματική κοιλότητα και στο έντερο, ενώ είναι υπεύθυνο για την πρόκληση μολύνσεων στον άνθρωπο και λιγότερο συχνά στα ζώα (Jones and Collins, 1986). Παρόλα αυτά, ορισμένα είδη *Propionibacterium* ευθύνονται για εκτενείς κοκκιωματώδεις αλλοιώσεις στα βοοειδή σε διάφορα όργανα, όπως για παράδειγμα τη κεφαλή, τη θωρακική και τη κοιλιακή κοιλότητα και το δέρμα (Forbes-Faulkner et al., 2000), όπως επίσης το *Propionibacterium acnes* απομονώθηκε σε ένα περιστατικό πλακουντίτιδας και αποβολής σε βοοειδές (Lyons et al., 2009).

Τέλος, στο δείγμα του κασεριού ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες του γένους *Streptococcus* και ειδικότερα τα είδη *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus merionis*, *Streptococcus minor*,

Streptococcus uberis και *Streptococcus suis*. Ο *Streptococcus suis* αποτελεί παθογόνο βακτήριο, κυρίως, των χοίρων αλλά έχει απομονωθεί και σε άλλα είδη ζώων συμπεριλαμβανομένου, τον σκύλο, την γάτα, τα μηρυκαστικά και τα άλογα (Hommeiz et al., 1988; Staats et al., 1997; Muckle et al., 2010). Θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο Okwumabua και συν. (2017) απομόνωσαν τον *Streptococcus suis* σε διάφορα κλινικά δείγματα βοοειδών που εξετάσαν τα τελευταία χρόνια, και συνυπήρχε μαζί με άλλα παθογόνα βακτήρια, με αποτέλεσμα να μην είναι ξεκάθαρη η παθολογική του σημασία.

Ο *Streptococcus uberis*, του οποίου αλληλουχίες εντοπίστηκαν εκτός από το δείγμα του κασεριού, και στα δείγματα του σκληρού τυριού και της γραβιέρας, αποτελεί συχνή αιτία πρόκλησης μαστίτιδας των βοοειδών. Το συγκεκριμένο βακτήριο εντοπίζεται συχνά στο περιβάλλον των βοοειδών, και σε περιπτώσεις που έχουμε χαμηλής ποιότητας υγιεινής του μαστού, μη σωστό σύστημα διαχείρισης του μαστού και τραυματισμούς των θηλών του μαστού, προκαλεί μαστίτιδες που εξαπλώνονται γρήγορα και σε μεγάλο αριθμό ζώων (Petersson-Wolfe and Currin, 2012).

Από όλα τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό ότι η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA των βακτηρίων, μας έδωσε τη δυνατότητα να ταυτοποιήσουμε μια πληθώρα αλληλουχιών στα δείγματα που αναλύσαμε, και να προσδιορίσουμε την οικογένεια, το γένος των βακτηρίων και σε πολλές περιπτώσεις η ταυτοποίηση να φθάσει και σε επίπεδο είδος βακτηρίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενώ είχαμε ταυτοποίηση του γένους, δεν υπήρχε δυνατότητα να γίνει ταυτοποίηση του είδους. Το παραπάνω μπορεί να οφείλετε, στην διακριτική ικανότητα τις τεχνικής και πιο συγκεκριμένα στον σχεδιασμό των εκκινητών οι οποίοι στοχεύουν το 80% της βάσης δεδομένων Greengenes, σε πιθανά λάθη κατά την αλληλούχιση τα οποία μειώνουν το συνολικό ποσοστό ομοιότητας τις αλληλουχίας επερώτησης με αυτές της βάσης δεδομένων και τέλος στην ύπαρξη των slash calls όπου δεν μπορεί να γίνει με ακρίβεια ο προσδιορισμός του είδους μεταξύ δυο πιθανών ειδών με πολύ μικρή διαφοροποίηση μεταξύ τους. Παράλληλα, η συγκεκριμένη μέθοδος μας έδωσε τη δυνατότητα να ταυτοποιήσουμε την ύπαρξη συγκεκριμένων βακτηρίων στα δείγματα, χωρίς όμως να είναι δυνατόν να προσδιορισθεί ποια από τα βακτήρια αυτά είναι «ζωντανά» και επομένως μπορούν να πολλαπλασιασθούν και να αναπτύξουν αποικίες.

Ορισμένα από τα είδη των βακτηρίων, των οποίων ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες, ήταν αναμενόμενο να εντοπισθούν δεδομένου ότι αποτελούν συστατικό των ποικίλων καλλιέργειών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή του τυριού, καθώς και των μεταβολών που πραγματοποιούνται σε όλη την παραγωγική διαδικασία γαλακτοκόμησης. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν αλληλουχίες βακτηρίων, που εντοπίζονται στο περιβάλλον των

κτηνοτροφικών εγκαταστάσεων των βοοειδών, όπως και αλληλουχίες βακτηρίων που ευθύνονται για νοσήματα βοοειδών, και όχι μόνο για την πρόκληση μαστίτιδας στα βοοειδή. Βέβαια, από τα δείγματα που εξετάσαμε το πιο «επιβαρυνόμενο» ήταν το δείγμα του κασεριού και το πιο πιθανό είναι αυτό να οφείλεται, στο ότι το γάλα που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του, θα πρέπει να είχε αυξημένο μικροβιακό φορτίο. Σύμφωνα με τον κανονισμό 853/2004 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με τον οποίο ορίζονται οι απαιτήσεις για την υγιεινή και ασφάλεια των τροφίμων ζωικής προέλευσης, το νωπό γάλα αγελάδων που χρησιμοποιείται για την παρασκευή γαλακτοκομικών προϊόντων σε θερμοκρασία 30 °C πρέπει να έχει περιεκτικότητα σε βακτήρια μικρότερη των 300 000 ανά ml. Αυτό σημαίνει ότι δύναται ένα εύρος στην ποσοτική εκτίμηση του γάλακτος αγελαδινής προέλευσης όσο αφορά τον αριθμό των βακτηρίων, χωρίς βέβαια να προσδιορίζονται τα είδη των βακτηρίων και ταυτόχρονα αποκλείονται τα παθογόνα βακτήρια τα οποία καθιστούν τα τρόφιμα επικίνδυνα για ανθρώπινα κατανάλωση. Στη δική μας εργασία θα πρέπει να αναφέρουμε ότι κανένα από τα βακτήρια που ταυτοποιήθηκαν είναι παθογόνο σύμφωνα με τον κανονισμό 2073/2005 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, και επομένως δεν τίθεται θέμα ασφάλειας των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι με τη μέθοδο αλυσιδωτή αντίδρασης της πολυμεράσης και αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA μπορέσαμε να ταυτοποιήσουμε και τα είδη των βακτηρίων που υπάρχουν στα δείγματα τυριών που εξετάσαμε, ακόμα και όταν αυτά υπάρχουν σε πολύ μικρό ποσοστό, και ίσως να ήταν αδύνατη η ανάπτυξή τους με τις μεθόδους που εξαρτώνται από τις καλλιέργειες λόγω του ανταγωνισμού μεταξύ των βακτηρίων. Παράλληλα, όμως, καταφέραμε να εντοπίσουμε ότι πιθανόν σε ένα δείγμα μας ο αριθμός των βακτηρίων του νωπού γάλακτος θα πρέπει να ήταν υψηλός και η υγιεινή του σε χαμηλό επίπεδο.

8. Βιβλιογραφία

- Addison S., Foote S., Reid N., Lloyd-Jones G. (2007). *Novosphingobium nitrogenifigens* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating diazotroph isolated from a New Zealand pulp and paper wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2467–2471
- Albano, H., Henriques, I., Correia, A., Hogg, T., & Teixeira, P. (2008). Characterization of microbial population of ‘Alheira’ (a traditional Portuguese fermented sausage) by PCR-DGGE and traditional cultural microbiological methods. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), 2187–2194

- Alegria A, Alvarez-Martin P, Sacristan N, Fernandez E, Delgado S, Mayo B (2009) Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casin, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int J Food Microbiol* 136:44–51
- Alemayehu D., Hannon J., McAuliffe O., Ross R. (2014). Characterization of plant-derived lactococci on the basis of their volatile compounds profile when grown in milk. *Int J Food Microbiol*, 172:57-61
- Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Pattono, D., Dalmasso, A., Civera, T., et al. (2010). Microbiota of the Planalto de Bolona: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 2211–2221
- Alves, M., Goncalves, T., & Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives fermentations. *Food Control*, 23, 363–368
- Aly, M.E. (1995). An attempt for producing low-sodium Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 52, 295-299
- Anifantakis, E.M. (1991). Traditional Feta cheese. In: R.K. Robinson, & A.Y. Tamime (Eds.), *Feta and Related Cheese* pp. 49-69. New York, NY, USA: Ellis Horwood.
- Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, et al. (2014). Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS ONE* 9:e90784
- Arroyo-Lopez, F. N., Duran-Quintana, M. C., Ruiz-Barba, J. L., Querol, A., & Garrido-Fernandez, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology*, 23, 791–796
- Asfour H., Anwer A., Nabih A., Abeer E. (2016). Some studies on *Pasteurella multocida* as a causative agent of mastitis in dairy cows and ewes. *Assiut Veterinary Medical Journal Assiut Vet. Med. J*, 62(150): 143-156
- Ashraf R. and Shah N. (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium spp.* in yoghurt--a review. *Int J Food Microbiol*. 149(3):194-208
- Aslam Z., Lee C., Kim K., Im W., Ten L., Lee S. (2007) *Methylobacterium jeotgali* sp. nov., a nonpigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57:566–571

- Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology (1998). In: Salminen, S., Von Wright, A., eds. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. pp 1-72 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc
- Axelsson, L. (1993) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In *Lactic Acid Bacteria* ed Salminen, S. and von Wright, A. pp. 1–63 New York: Marcel Dekker
- Aymerich, T., Artitgas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M., & Hugas, M. (2000). Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of *in vitro* production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 686-694
- Azarnia, S., Ehsani, M.R., & Mirhadi, S.A. (1997). Evaluation of the physicochemical characteristics of the curd during the ripening of Iranian brine cheese. *International Dairy Journal*, 7, 473-478
- Baer, A. and Ryda, I. (1992) Serological identification of propionibacteria in milk and cheese samples. *International Dairy Journal*, 2: 299-310
- Basso, A., Goffo, A., Rossi, G., & Conterno, N. (1994). A preliminary characterization of the microflora of Montasio cheese-Occurrence of galactose fermenting strains in cheese and in natural starter cultures. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 12, 139-144
- Baumann P., Doudoroff M., Stanier RY. (1968). A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*) *J Bacteriol*, 95:1520–41
- Beerens H., Hass Brac de la Perriere B., Gavini F. (2000). Evaluation of the hygienic quality of raw milk based on the presence of bifidobacteria: the cow as a source of faecal contamination. *Int J Food Microbiol*, 54(3):163-9
- Bel S, Elkis Y, Elifantz H, et al. (2014) Reprogrammed and transmissible intestinal microbiota confer diminished susceptibility to induced colitis in TMF-/- mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(13):4964-4969
- Belén Flòrez, A., & Mayo, B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 165–171
- Beresford T, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* 11:259–274
- Beresford T., Williams A. (2004). The microbiology of cheese ripening. In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. P.F. Fox, (Ed.), Vol. 1: General Aspects. London: Academic press, pp: 287-317

- Bernardet J.-F., Nakagawa Y., Holmes B. (2002). Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1049–1070.
- Bernardet J.-F., Vancanneyt M., Matte-Tailliez O., Grisez L., Tailliez P., Bizet C., Nowakowski M., Kerouault B., Swings J. (2005). Polyphasic study of *Chryseobacterium* strains isolated from diseased aquatic animals. *Syst Appl Microbiol* 28, 640–660
- Bernardet J.-F., Hugo C., Bruun B. (2006). The genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn, vol. 7, pp. 638–676. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer
- Bertozzi, L., & Panari, G. (1993). Cheeses with Appellation d' Origine Contrôlée (AOC): factors that affect quality. *International Dairy Journal*, 3, 297-312
- Blainey PC, Milla CE, Cornfield DN, and Quake SR (2012). Quantitative analysis of the human airway microbial ecology reveals a pervasive signature for cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 4: 153ra130
- Bockelmann W. and Hoppe-Seyler T. (2001). The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* , 11:307–314
- Bokulich N., Subramanian S., Faith J., Gevers D., Gordon J., Knight R., Mills D., Caporaso G. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods*, 10(1): 57–59
- Bonetta, S., Bonetta, S., Carraro, E., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2008). Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology*, 25, 786–792
- Bonjoch X., Balleste E., Blanch AR. (2005). Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution. *Water Res*, 39(8):1621-7
- Britz, T. J. and Riedel, K-H. J. (1994). *Propionobacterium* species diversity in Leerdammer cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 22: 257-267
- Broome, M.C., & Limsowtin, G.K.Y. (1998). Starter peptidase activity in maturing cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53, 79-82
- Bustamante, M., Chavarri, F., Santisteban, A., Ceballos, G., Hernandez, I., Miguelez, M.J., Aranburu, I., Barron, L.J.R., Virto, M., & De Renobales, M. (2000). Coagulating and lipolytic activities of artisanal lamb rennet pastes. *Journal of Dairy Research*, 67, 393–402

- Callon, C., Delbes, C., Duthoit, F., & Montel, M. C. (2006). Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 172–180
- Casalta, E., Sorba, J. M., Aigle, M., & Ogier, J. C. (2009). Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 243–251
- Casalta, E., Vassal, Y., Desmazeaud, M.J., & Casabianca, F. (1995). Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* isolated from Corsican goat milk and cheese. *Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie*, 28, 291-299
- Centeno, J.A., Menendez, S., Hermida, M.A., & Rodriguez-Otero, J.L. (1999). Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 48, 97-101
- Cerqueira G. and Peleg A. (2011). Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life*, 63(12):1055-60
- Chaia, A. P., De Ruiz Holgado, A. P. and Oliver, G. (1990). Peptide hydrolases of propionibacteria: effect of pH and temperature. *Journal of Food Protect*, 53: 237-240
- Chaitali Parikh, Elena Bolchacova, Stephen Jackson (2015). Rapid 16S Next Generation Sequencing for Bacterial Identification in Polymicrobial Sample. ThermoFisher SCIENTIFIC
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 1–27
- Cintas, L.M., Casaus, P., Havarstein, L.S., Hernandez, P.E., & Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel see-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4321-4330
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C., & Comi, G. (2004). Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1883–1894
- Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K., Urso, R., Cantoni, C., & Comi, G. (2009). Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Science*, 82, 125–132

- Cocolin, L., Alessandria, V., Dolci, P., Gorra, R., & Rantsiou, K. (2013). Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 167: 29–43
- Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP (2003) Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait* 83:269–306
- Cogan, T.M., & Daly, C. (1987). Cheese starter cultures. In: P.F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1 pp. 178-249. London, UK: Elsevier Applied Science.
- Collins M.D., Farrow F.A.E., Phillips B.A., Kandler O. (1984). *Streptococcus garviae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. *Journal of Genetic Microbiology* 129: 3427-3431
- Collins M. D. (2004). *Corynebacterium caspium* sp. nov., from a Caspian seal (*Phoca caspica*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54 (3): 925–8.
- Coppola S, Blaiotta G, Ercolini D, Moschetti G (2001) Molecular evaluation of microbial diversity occurring in different types of Mozzarella cheese. *J Appl Microbiol* 90:414–420
- Coppola R, Blaiotta G, Ercolini D (2008) Dairy products. In: Cocolin L, Ercolini D (eds) *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. , pp 31–90 Springer, New York
- Corroler, D., Desmaures, N., & Guéguen, M. (1998). Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2011–2020
- Creamer, L.K., & Olson, N.F. (1982). Reological evaluation of maturing Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 47, 631-636
- Dassi E, Ballarini A, Covello G, et al. (2014). Enhanced microbial diversity in the saliva microbiome induced by short-term probiotic intake revealed by 16S rRNA sequencing on the Ion Torrent PGM platform. *J Biotech* 190:30-9
- Davis JC. (1965). *Cheese, Basic technology*. Vol 1, Churchill Livingstone, London
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Gallo, G., Curci, M., Siragusa, S., Crecchio, C., et al. (2007). Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 69–82

- De Dea Lindner J, Bernini V, De Lorentiis A, Pecorari A, Neviani E, Gatti M (2008) Parmigiano Reggiano cheese: evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. *Dairy Sci Technol* 88:511–523
- De Vuyst, L. (1994). Bacteriocins of Enterococcus. In: L. De Vuyst, & E.J. Vandamme (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications* pp. 511-513. London, UK: Blackie Academic and Professional.
- Deeth, H.S., & Fitz-Gerald, C.H. (1976). Lipolysis in dairy products: A review. *Australian Journal of Dairy Technology*, 31, 53-64
- Delacroixbuchet, A., & Trossat, P. (1991). Proteolysis and texture of Gruyere type cheese. 1. Influence of water activity. *Lait*, 71, 299-311
- Delacroixbuchet, A., & Fournier, S. (1992). Proteolysis and texture of Gruyere type cheese. 2. Influence of chymosin and cheese-making conditions. *Lait*, 72, 53-72
- Delbès C, Montel MC (2005) Design and application of a Staphylococcus-specific single strand conformation polymorphism–PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Lett Appl Microbiol* 41:169–174
- Delbes, C., Ali-Mandjee, L., & Montel, M. C. (2007). Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1882–1891
- Delcenserie V., Bechoux N., China B., Daube G., Gavini F. (2005). A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture-based methods. *J Microbiol Methods*, 61(1):55-67
- Delcenserie V., Gavini F., China B., Daube G. (2011). *Bifidobacterium pseudolongum* are efficient indicators of animal fecal contamination in raw milk cheese industry. *BMC Microbiology*, 11:178
- Descheemaeker P., Lammens C., Pot B., Vandamme P., Goossens H. (1997) Evaluation of arbitrarily primed PCR analysis and Pulsed-field gel electrophoresis of large genomic DNA fragments for identification of enterococci important in human medicine. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(2): 555-561
- Desmazeaud, M.J and Gripon, J.C. (1977). General mechanism of protein breakdown during cheese ripening. *Milchwissenschaft*, 32, 731-734
- Dogan B. and Boor KJ. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas spp.* isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl Environ Microbiol*, 69(1):130-8.

- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Zeppa, G., & Cocolin, L. (2008). Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *International Journal of Applied Microbiology*, 122, 302–311
- Dolci P, Alessandria V, Rantsiou K, Bertolino M, Cocolin L (2010) Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *Int J Food Microbiol* 143:71–75
- Dolci, P., Zenato, S., Pramotton, R., Barmaz, A., Alessandria, V., Rantsiou, K., et al. (2013). Cheese surface microbiota complexity: RT-PCR-DGGE, a tool for a detailed picture? *International Journal of Food Microbiology*, 162, 8–12
- Doyle C., Gleeson D., O'Toole P., Cottera P. (2017). Impacts of Seasonal Housing and Teat Preparation on Raw Milk Microbiota: a High-Throughput Sequencing Study. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(2): e02694-16
- Drinan, F. D. and Cogan, T. M. (1992). Detection of propionic acid bacteria in cheese. *Journal of Dairy Research*, 59:65-69
- Duthoit F, Godon J-J, Montel M-C (2003) Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol* 69:3840–3848
- Efthymiou, C.C. (1967). Major free fatty acids of feta cheese. *Journal of Dairy Science*, 50, 20-24
- Eliskases-Lechner, F. and Ginzinger, W. (1995). The yeast flora of surface-ripened cheeses. *Milchwiss.* 50(8), 458-462
- El-Salam, A.M.H. (1987). Domiati and Feta type cheese. In: P.F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2 pp. 277-309. London, UK: Elsevier Applied Science.
- Engels, W.J.M., & Visser, S. (1994). Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavor of different types of cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 48, 127-140
- Engesser D.M., Hammes W.P. (1994) Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria. *Systematic of Applied Microbiology*, 79:763-76
- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S (2001) The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst Appl Microbiol* 24:610–617

- Ercolini, D., Hill, P. J., & Dodd, C. E. R. (2003). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3540–3548
- Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297–314
- Ercolini, D., De Filippis, F., La Storia, A., & Iacono, M. (2012). “Remake” by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8142–8145
- Erkmen, O. (1995). Behaviour of *Staphylococcus aureus* in Turkish Feta cheese during manufacture and ripening. *Journal of Food Protection*, 58, 1201-1205
- Feurer C., Irlinger F., Spinnler H., Glaser P., Vallaey T. (2004a). Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *J Appl Microbiol* 97:546–556
- Feurer C., Vallaey T., Corrieu G., Irlinger F. (2004b). Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a French soft, red-smear cheese? *J Dairy Sci* 87:3189–3197
- Fitzsimons N., Cogan T., Condon S Beresford T. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Appl Environ Microbiol* 65:3418–3426
- Fitzsimons N., Cogan, T., Condon, S., & Beresford, T. (2001). Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 600–608
- Fonseca, S., Ouoba, L. I. I., Franco, I., & Carballo, J. (2013). Use of molecular methods to characterize the bacterial community and to monitor different native starter cultures throughout the ripening of Galician chorizo. *Food Microbiology*, 34, 215–226
- Fontecha J., Pelaez C., Juares M., Requena T., Gomez, C. (1990). Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat’s cheeses. *Journal of Dairy Science*, 73, 1150-1157
- Forbes-Faulkner J., Pitt D., Norton J. et al. (2000). Novel *Propionibacterium* infection in cattle. *Aust Vet J*, 78:175– 178
- Fortina M., Ricci G., Mora D., Manachini P. (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1717-1721

- Fortina M., Ricci G., Mora D., Parini C., Manachini P. (2001). Specific identification of *Lactobacillus helveticus* by PCR with pepC, pepN and htrA targeted primers. *FEMS Microbiology Letters*, 198, 85–89
- Fortina M., Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A., Manachini P. (2003). Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology*, 20, 397–404
- Fournier P., Vallenet D., Barbe V., Audic S., Ogata H., Poirel L., Richet H., Robert C., Mangenot S., Abergel C., Nordmann P., Weissenbach J., Raoult D., Claverie J. (2006) Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet*, 2(1): e7
- Fournier P.E. and Richet H. (2006). The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*, 42:692–9
- Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72, 1379-1400
- Fox, P. F. (1993). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 2 Major Cheese Groups, Second edition, Chapman & Hall, pp. 137-170
- Fox P.F., Law J., Mc Sweeney P.L.H., Wallace J. (1999). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1, Chapter 10: Biochemistry of cheese ripening (Aspen Publication)
- Fox P. F., McSweeney L. H., Cogan T. M., Guinee P. T. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 2 Major Cheese Groups, Third edition, Elsevier Academic Press, p.199-279
- Franz C., Stiles M., Schleifer K., Holzapfel W. (2003). Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105–122
- Freitas A. and Malcata F. (1998). Lipolysis in Picante cheese: Influence of milk type and ripening time on free fatty acid profile. *Lait*, 78, 251-258
- Gala E., Landi S., Solieri L., Nocetti M., Pulvirenti A., Giudici, P. (2008). Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 347–351
- Gavini F., Delcenserie V., Kopeinig K., Pollinger S., Beerens H., Bonaparte C., Upmann M. (2006). *Bifidobacterium* species isolated from animal feces and from beef and pork meat. *J Food Prot*, 69(4):871-7.
- Gevers D., Huys G., Swings J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 31–36

- Giraffa G. (1995). Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiology*, 12, 291-299
- Giraffa G. and Neviani E. (2000). Molecular identification and characterisation of food-associated lactobacilli. *Italian Journal of Food Science*, 12, 403–423
- Giraffa G. (2007). Enterococci and dairy products. In: H. Huy (Ed.), *Handbook of Food Production Manufacturing*, Vol. 2 pp. 85-97. New York, NY, USA: John Wiley & Sons Inc.
- Gonza' lez C., Santos J., Garcia-Lopez M., Otero A. (2000). Psychrobacters and related bacteria in freshwater fish. *J Food Prot*, 63: 315–321
- Grappin R., Rank T., Olson N. (1985). Primary proteolysis of cheese during ripening: A review. *Journal of Dairy Science*, 68, 531-540
- Hantsis-Zacharov E. and Halpern M. (2007). Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Appl Environ Microbiol. Nov*, 73(22): 7162–7168
- Hegazi F.Z. (1990). Extracellular proteinase of *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*: productionmilk-clotting and proteolytic activities. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*, 8, 341-348
- Holzappel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*, 73(suppl):365S-73S
- Hommeiz J., et al. (1988). *Streptococcus suis* and other streptococcal species as a cause of extramammary infection in ruminants. *Vet Rec*, 123:626–627.
- Horner S., Sturridge M., Swanton R. (1992). *Propionibacterium acnes* causing an aortic root abscess. *British Heart Journal*, 68: 218-220
- Howard A., O'donoghue M., Feeney A., Sleator R. D. (2012). *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3:243–250
- Hu Y., Xia W., Ge C. (2006). Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages. *World J Microbiol Biotechnol.*, 7: 1-11
- Hugo C. J., Jooste P. J., Segers P., Vancanneyt M., Kersters K. (1999). A polyphasic taxonomic study of *Chryseobacterium* strains isolated from dairy sources. *Syst Appl Microbiol*, 22: 586–595
- Hugo C. J., Segers P., Hoste B., Vancanneyt M., Kersters, K. (2003). *Chryseobacterium joostei* sp. nov., isolated from the dairy environment. *Int J Syst Evol Microbiol* , 53:771–777

- Irlinger F. and Mounier J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr Opin Biotechnol*, 20(2):142-8
- Jany J. and Barbier G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol* 25:839–848
- Jensen J., Reinbold G., Washam C., Vedamuthu E. (1975a). Role of enterococci in Cheddar cheese: proteolytic activity and lactic acid development. *Journal of Milk and Food Technology*, 38, 3-7
- Jensen M., Webster J., Strauss N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer region polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 945–952
- Jeyaram K., Singh M., Capece A., Romano P. (2008). Molecular identification of yeast species associated with ‘Hamei’—a traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 115–125
- Jin Y., and Park Y.W. (1995). Effects of aging time and temperature on proteolysis of commercial goat milk cheeses produced in the United States. *Journal of Dairy Science*, 78, 2598-2608
- Jones D. and Collins M. (1986). Irregular, non-sporing Grampositive rods. In: Bergey’s manual of systemic bacteriology, ed. Sneath PHA, vol. 2, pp. 1261–1434. Williams & Wilkins, Baltimore, MD
- Junemann S., Prior K., Szczepanowski R., et al. (2012) Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by Ion Torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS ONE* 7: e41606
- Juste A., Thomma B., Lievens B. (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, 25, 745–761.
- Kable M., Srisengfa Y., Laird M., et al. (2016). The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio*, 7:e00836–16
- Kanoe M., Imagawa H., Toda M. (1975). Distribution of *Fusobacterium necrophorum* in bovine alimentary tracts. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Yamaguti University, Japan*, 26:161-172
- Kato Y., Asahara M., Goto K., Kasai H., Yokota A. (2008). *Methylobacterium persicinum* sp. nov., *Methylobacterium komagatae* sp. nov., *Methylobacterium brachiatum* sp. nov., *Methylobacterium tardum* sp. nov. and *Methylobacterium gregans* sp. nov., isolated

- from Freshwater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1134–1141
- King E.L., Bachoon D.S., Gates K.W. (2007). Rapid detection of human fecal contamination in estuarine environments by PCR targeting of *Bifidobacterium adolescentis*. *J Microbiol Methods*, 68(1):76-81
- Kloos W., Schleifer KH.. (1986) In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. PHA S, S M, ME S, JG H, editors. Baltimore: Williams & Wilkins
- Kommedal O, Wilhelmsen MT, Skrede S, et al. (2014). Massive parallel sequencing provides new perspectives on bacterial brain abscesses. *J Clin Microbiol* 52(6):1990-1997
- Kondyli, E., Massouras, T., Katsiari, M.C., & Voutsinas, L.P. (2003a). Free fatty acids and volatile compounds in low-fat Kefalograviera-type cheese made with commercial adjunct cultures. *International Dairy Journal*, 13, 47–54
- Kondyli, E., Massouras, T., Katsiari, M.C., & Voutsinas, L.P. (2003b). Lipolysis and volatile compounds in low-fat Kefalograviera-type cheese made with commercial special starter cultures. *Food Chemistry*, 82, 203–209
- Kubota Y. and Morimoto K. (2006). Association between cases of bovine abscess during the previous 20-year period in Hiroshima prefecture and *Helcococcus ovis*. *Hiroshima J. Vet. Med*, 21:24–27
- Kutzer P., Schulze C., Engelhardt A., Wieler L., Nordhoff M. (2008) *Helcococcus ovis*, an Emerging Pathogen in Bovine Valvular Endocarditis. *J of Clinical Microbiology*, 46(10):3291–3295
- Lai C., Cheng A., Liu W., Tan C., Huang Y., Chung K., Lee M., Hsueh P. (2011). Infections Caused by Unusual *Methylobacterium* Species. *J of Clinical Microbiology*, Sept: 3329–3331
- Law B.A. (1987). Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: P.F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1 pp. 365-392. London, UK: Elsevier Applied Science.
- Lawrence R., Creamer L., Gilles J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 72, 1748-1760
- Lawrence R., Heap H., Gilles J. (1984). A controlled approach to cheese technology. *Journal of Dairy Science*, 67, 1632-1645
- Ledda A., Scintu M., Pirisi A., Sanna S., Mannu L. (1994). Caratterizzazione tecnologica di ceppi di lattococchi e di enterococchi per la produzione di formaggio pecorino Fiore sardo. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*, 45, 443-456

- Lick S., Keller M., Bockelmann W., Heller K. J. (1996). Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 74–77
- Litopoulou-Tzanetaki E. (1977). Staphylococci and micrococci in Kefalotyri cheese. *Milchwissenschaft*, 32: 211-214
- Litopoulou-Tzanetaki E. and Tzanetakis N. (2011). Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research* 101(1-3), 17–32
- Lopez-Diaz T., Santow J., Gonzales C., Moreno B., Garcia M.L. (1995). Bacteriological quality of traditional blue cheese. *Milchwissenschaft*, 50, 503-505
- Lucey J.A. and Fox P.F. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture-A review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1714-1724
- Lyons J., Bemis D., Bryant M., Kania S., Abd-Eldaim M., Newman S. (2009). Isolation of *Propionibacterium acnes* from a case of placentitis and abortion in a cow *J Vet Diagn Invest* 21:274–277
- Manolkidis C., Polychroniada A., Alichanidis E. (1970). Study of proteolysis during ripening of Teleme cheese. *Lait*, 50, 128-135
- Mansour R. and Alais C. (1972). Etude du salage et de l' affinage du fromage en saumure. I. Aspect biochimique: Evolution de la composition du fromage et rendement. *Lait*, 52, 515-535
- Mansour R. and Alais C. (1973). Etude du salage et de l' affinage du fromage en saumure. III. Aspect bacteriologique. *Lait*, 53, 137-145
- Marcoux V., Beaulieu Y., Champagne C., Goulet, J. (1992). Production of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* in whey-based media. *Journal of Fermented Bioenergy*, 74: 95-99
- Martin-Platero A., Maqueda M., Valdivia E., Purswani J., Martinez-Bueno M. (2009) Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiol* 26:294–304
- McGunan W., Emmons D., Larmond E. (1979). Influence of volatile and nonvolatile fraction on intensity of Cheddar cheese flavor. *Journal of Dairy Science*, 62, 398-403
- McMurdie and Holmes (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE. 8(4):e61217
- McSweeney, P. and Souza J.M. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait*, 80, 293-324
- Meisel J., Wolf G., Hammes W.P. (1994) Heme-dependent cytochrome formation in *Lactobacillus maltaromicus*. *Systematics of Applied Microbiology*, 17:20–3

- Milani C., Hevia A., Foroni E., et al. (2013). Assessing the fecal microbiota: an optimized Ion Torrent 16S rRNA gene-based analysis protocol. *PLoS ONE* 8:e68739
- Mir S., Nagy-Szakal D., Dowd S., et al. (2013) Prenatal methyl-donor supplementation augments colitis in young adult mice. *PLoS ONE* 8:e73162
- Moreno M., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1–24
- Morimoto K., Kubota Y., Fujita A., Kawamoto C., Ibaraki Y. (2006). A case of bovine valvular endocarditis in which *Helcococcus ovis* is isolated. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc*, 59:325–328
- Mounier J., Monnet C., Jacques N., Antoinette A., Irlinger F. (2009). Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *Int J Food Microbiol* 133:31–37
- Muckle A. , et al. (2010). Isolation of *Streptococcus suis* from urine of a clinically ill dog. *Can Vet J*, 51:773–774
- Muyzer G., de Waal E., Uitterlinden A. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695–700
- Naser S.M., Vancanneyt M., De Graef E., Devriese L.A., Snauwaert C., Lefebvre K., Hoste B., Svec P., Decostere A., Haesebrouck F., Swings J. (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2177-2182
- Nebra Y., Bonjoch X., Blanch A.R. (2003). Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl Environ Microbiol*, 69(5):2651-6.
- Neviani E., Mucchetti G., Contarini G., Garini S. (1982). Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. I. Loro presenza in formaggi di monte e impiego in un innesto selezionato. *Latte*, 7, 722-728
- Nguyen D., Van Hoorde K., Cnockaert M., De Brandt E., De Bruyne K., Le B. T., et al. (2013). A culture-dependent and -independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product. *Food Research International*, 50, 232–240
- Okwumabua O., Peterson H., Hsu H., Bochsler P., Behr M. (2017). Isolation and partial characterization of *Streptococcus suis* from clinical cases in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1:137–142

- Olson N., Gunasekaran S., Bogenrief D.D. (1996). Chemical and physical properties of cheese and their interactions. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 279-294
- Ondov B., Bergman N., Phillippy A. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 30; 12(1):385.
- Ordonez J., Barneto R., Ramos M. (1987). Studies on Manchego cheese ripened in olive oil. *Milchwissenschaft*, 33, 609-612
- Otto M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7(8): 555–567
- Pappas C.P., Kondyli E., Voutsinas L.P., Mallatou H. (1996). Effects of starter level, draining time and aging on the physicochemical, organoleptic and rheological properties of Feta cheese. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 49, 73-78
- Parente E., Cogan T.M. (2004). Starter cultures: general aspects. In: P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee, pp. 123-147eds, *CHEESE Chemistry, Physics and Microbiology*. Paris: Elsevier Academic Press
- Petersson-Wolfe C. and Currin J. (2012). *Streptococcus uberis*: A practical summary of controlling mastitis. College of Agriculture and Life Sciences, Virginia Polytechnic Institute and State University, www.ext.vt.edu
- Petrof E., Gloor G., Vanner S., et al. (2013). Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: ‘RePOOPulating’ the gut. *Microbiome* 1:3
- Pogačić T., Kelava N., Zamberlin Š., Dolenčić-Špehar I., Samaržija D. (2010a) Methods for culture independent identification of lactic acid bacteria in dairy products. *Food Technol Biotechnol* 48:3–10
- Polychroniadou A. and Vlachos J. (1979). The free amino acids of Teleme cheese. *Lait*, 59, 234-243
- Post K., Rushton S., Billington S. (2003). Valvular endocarditis associated with *Helcococcus ovis* infection in a bovine. *J. Vet. Diagn. Investig*, 15:473–475
- Pritchard G., and Coolbear T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 179-206
- Psoni L., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. (2003). Microbiological quality of traditional blue cheese. *Milchwissenschaft*, 50, 503-505.
- Queck SY. and Otto M. (2008). *Staphylococcus epidermidis and other Coagulase-Negative Staphylococci*. *Staphylococcus: Molecular Genetics*. Caister Academic Press.

- Radostts O., Gay C., Hinchcliff K. et al. (2007) (Eds). Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 10.ed. Philadelphia: Saunders,. p.724-725.
- Ramkumar C., Creamer L.K., Johnston K.A., Bennett R.J. (1997). Effect of pH and time on the quantity of readily available water within fresh cheese curd. *Journal of Dairy Research*, 64, 123-134
- Randazzo C., Torriani S., Akkermans A., de Vos W., Vaughan E. (2002). Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl Environ Microbiol* 68:1882–1892
- Randazzo C., Vaughan E., Caggia C. (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1–2), 1–8
- Randazzo C., Caggia C., Neviani E. (2009). Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J Microbiol Meth* 78:1–9
- Randazzo C., Ribbera A., Pitino I., Romeo F., Caggia C. (2012). Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*, 32, 87–96
- Rantsiou K., Comi G., Cocolin L. (2004). The rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations. *Food Microbiol* 21:481–487
- Rantsiou K., Urso R., Dolci P., Comi G., Cocolin L (2008b) Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *Int J Food Microbiol* 126:36–42
- Raphaelides S. and Antoniou K.D. (1996). The effect of ripening on the mechanical-properties of traditional and ultrafiltered Teleme cheeses. *Milchwissenschaft*, 51, 82-85
- Rasolofo E., St-Gelais D., LaPointe G., Roy D. (2010). Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int J Food Microbiol* 138:108–118
- Ribeiro M.G., Lara G.H.B., Fernandes M.C., Paes A.C., Motta R.G., Siqueira A.K., Salerno T., Listoni F.J.P. (2010) Bovine mastitis by *Pasteurella multocida*: A study of nine cases. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62(4):985-988
- Robert H., Gabriel V., Fontagné-Faucher C. (2009). Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 53–59

- Robinson R. K. (1990). Dairy Microbiology. Elsevier Applied Science, Chapman & Hall, 2nd edition, volume 2, 203-204
- Rosenthal M., Aiello A., Chenoweth C., et al. (2014). Impact of technical sources of variation on the hand microbiome dynamics of healthcare workers. *PLoS ONE* 9:e88999
- Rosenthal M.E., Rojzman A.D., Frank E. (2012). *Fingoldia magna* (formerly *Peptostreptococcus magnus*): an overlooked etiology for toxic shock syndrome? *Med Hypotheses*, 79(2):138-40
- Roudotalgaron F. (1996). The taste of amino acids, peptides and proteins: Examples of taste peptides in casein hydrolysates. *Lait*, 76, 313-348
- Ruisheng A., Srinand S., Parwinder G. (2008). *Moraxella osloensis* Gene Expression in the Slug Host *Deroceras reticulatum*. *BMC Microbiology*. 8: 19
- Salipante S., Sengupta D., Rosenthal C. et al. (2013a). Rapid 16S rRNA next generation sequencing of polymicrobial clinical samples for diagnosis of complex bacterial infections. *PLoS ONE* 8:e65226
- Salipante S.J., Sengupta D.J., Hoogestraat D.R., et al. (2013b). Molecular diagnosis of *Actinomadura madurae* infection by 16S rRNA deep sequencing. *J Clin Microbiol* 51(12):4262-4265
- Samelis J., Bleicher A., Delbès-Paus C., Kakouri A., Neuhaus K., Montel M. (2011). FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiology*, 28:76-83
- Samelis J., Kakouri A., Pappa E.C., Matijasic B.B., Georgalaki M. D., Tsakalidou E., Rogelj A. (2010). Microbial stability and safety of traditional Greek Graviera cheese: characterization of the lactic acid bacterial flora and culture-independent detection of bacteriocin genes in the ripened cheeses and their microbial consortia. *J. Food Prot.*, 73, 1294–1303
- Sánchez J., Rossetti L., Martínez B., Rodríguez A., Giraffa G. (2006). Application of reverse transcriptase PCR-based T-RFLP to perform semi-quantitative analysis of metabolically active bacteria in dairy fermentations. *J Microbiol Meth* 65:268–277
- Sandine W. E. and Elliker P. R. (1970). Microbially induced flavours and fermented foods flavour on fermented dairy products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 18: 557-562

- Santarelli M., Gatti M., Bernini C., Zapparoli G., Neviani E. (2008). Whey starter for Grana Padano cheese: effect of technological parameters on viability and composition of the microbial community. *Journal of Dairy Science*, 91, 883–891
- Saubusse M., Millet L., Delbes C., Callon C., Montel M. (2007). Application of single strand conformation polymorphism–PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 116:126–135
- Schleifer K. H., Kraus J., Dvorak C., Kilpper-Balz R., Collins M. D., Fischer W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6: 183-95
- Schleifer K.H., Ehrmann M., Beimfohr C., Brockmann E., Ludwig W., Amann R. (1995) Application of Molecular Methods for the Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria. *International Dairy Journal*, 5: 1081-1094
- Schultz M.E. (1952) Klassifizierung von Kase. *Milchwissenschaft* 9:292
- Schütte U., Abdo Z., Bent S., Shyu C., Williams C., Pierson J., Forney L. (2008). Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Appl Microb Biotechnol* 80:365–380
- Siafaras G., Hatzikamari M., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. (2008). Antibacterial activities of the surface microflora of Kefalograviera cheese. *Food Control*, 19, 898-905
- Siewert R. (1986). Zur Bedeutung der Hefen bei der Reifung von Camembert und Brie. *Dtsch. Mol. Ztg.* 35, 1134-1138
- Singh T.K., Fox P.F., Healy, A. (1995). Water-soluble peptides in Cheddar cheese-Isolation and identification of peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction. *Journal of Dairy Research*, 62, 629-640
- Staats J.J., et al. (1997). *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun*, 21:381–407
- Stackebrandt E., Koch C., Gvozdiak O., Schumann P. (1995). Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus Cohn 1872* gen. emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 682-692
- Stackebrandt E., Rainey F., Ward-Rainey N. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:479–491
- Tadepalli S., Narayanan S.K., Stewart G.C., Chengappa M.M., Nagaraja T.G. (2009) *Fusobacterium necrophorum*: a ruminal bacterium that invades liver to cause abscesses in cattle. *Anaerobe*, 15(1-2):36-43

- Tan L. and Grewal P. (2001). Pathogenicity of *Moraxella osloensis*, a Bacterium Associated with the Nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*, to the Slug *Deroceras reticulatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11): 5010–6
- Tanasupawat S., Kommanee J., Yukphan P., Nakagawa Y., Yamada Y. (2011). Identification of *Acetobacter* strains from Thai fermented rice products based on the 16S rRNA gene sequence and 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer restriction analyses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91, 2652–2659
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J., Ugarte E., Munoz-Tamayo R., Paslier DLE., Nalin R., Dore J., Leclerc M. (2009). Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol*, 11:2574-2584
- Temmerman R., Huys G., Swings J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 348–359
- Terzic-Vidojevic A., Vukasinovic M., Veljovic K., Ostojic M., Topisirovic, L. (2007). Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlata cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 36–42
- ThermoFisher SCIENTIFIC, Ion Torrent (2014). 16S rRNA Sequencing An integrated research solution for bacterial identification using 16S rRNA sequencing on the Ion PGM™ System with Ion Reporter™ Software
- Thompson T.L and Marth, E.H. (1986). Changes in Parmesan cheese during ripening: Microflora –coliforms, enterococci, anaerobs, propionibacteria and staphylococci. *Milchwissenschaft*, 41, 201-204
- Tofalo R., Perpetuini G., Schirone M., Suzzi G., Corsetti, A. (2013). Yeast biota associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 203–208
- Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. (1999). Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4351–4356
- Torriani S., Felis G. E., Dellaglio F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3450–3454
- Trovatelli L.D. and Schliesser A. (1987). Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwissenschaft*, 42, 717-719

- Tsakalidou E., Manolopoulou E., Tsilibari V., Georgalaki M., Kalantzopoulos G. (1993). Esterolytic activities of *Enterococcus durans* and *E. faecium* strains isolated from Greek cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 47, 145-150
- Tulasne J. and Béguin J. (1982). Ovine Footrot: General report. *Proceedings of the 4th International Symposium on disorders of the ruminant digit, Paris, France*
- Turner K.W. and Thomas D.T. (1980). Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 15, 265
- Tzanetakis N. and Litopoulou-Tzanetaki E. (1992). Changes in numbers and kinds of lactic-acid bacteria in Feta and Teleme, two Greek cheeses from ewe's milk. *Journal of Dairy Science*, 75, 1389-1393
- Tzanetakis, N., Hatzikamari, M. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (1996). Yeasts of the surface microflora of Feta, a traditional Greek cheese. *Proceedings of the Symposium: "Yeasts in the Dairy Industry: Positive and negative aspects"*, organised by Group F47, FIL-IDF, Copenhagen, 2-3 September, 1996
- Tzanetakis N., Vafopoulou-Mastrojiannaki A., Litopoulou-Tzanetaki E. (1995). The quality of white-brined cheese from goat's milk made with different starters. *Food Microbiology*, 12, 55-63
- Urbach G. (1997). The flavor of milk and dairy products: II. Cheese: contribution of volatile compounds. *Int. J. Dairy Techno*, 50:79-89
- Urso R., Comi G., Coccolin L. (2006). Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 671–680
- Uyeno Y., Sekiguchi Y., Kamagata Y. (2010). rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. *Lett Appl Microbiol*, 51(5):570-7
- Vacheyrou M., Normand A.-C., Guyot P., Cassagne C., Piarroux R., Bouton Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol*, 146: 253–262
- Vafopoulou A., Zerfiridis G., Alichanidis E. (1989). Accelerated ripening of Feta cheese, with heat-shocked cultures or microbial proteinases. *Journal of Dairy Research*, 56, 285-296
- Van Hoorde K, Heyndrickx M, Vandamme P, Huys G (2010a) Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiol* 27:425–433

- Van Hoorde K., Van Leuven I., Dirinck P., Heyndrickx M., Coudijzer K., Vandamme P., et al. (2010). Selection, application and monitoring of *Lactobacillus paracasei* strains as adjunct cultures in the production of Gouda-type cheeses. *International Journal of Applied Microbiology*, 144, 226–235
- Vancanneyt M., Zamfir M., Devriese L.A., Lefebvre K., Engelbeen K., Vandemeulebroecke K., Amar M., De Vuyst L., Haesebrouck F., Swings J. (2004). *Enterococcus saccharominimus* sp. Nov., from dairy products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 2175-2179
- Villani F. and Coppola, S. (1994). Selection of *enterococcal strains* for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, 44, 97-105
- Virto M., Chavarri F., Bustamante M.A., Barron L.J.R., Aramburu M., Vicente M.S., Perez-Elortondo F.J., Albisu M., & De Renobales M. (2003). Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. Lipolysis and flavour. *International Dairy Journal*, 13, 391–399
- Visser S. (1993). Proteolytic-enzymes and cheese ripening. Proteolytic-enzymes and their relation to cheese ripening and flavor. An overview. *Journal of Dairy Science*, 76, 329-350
- Vivier D., Rivemale M., Reverbel J.P., Ratamahenina R., Galzy P. (1994). Study of the growth of yeasts from feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 22:207-215
- Ward P. and Roy D. (2005). Review of molecular methods for identification, characterization and detection of *bifidobacteria*. *Lait* 85:23–32
- Westall S. and Filtenborg O. (1998). Yeast occurrence in Danish Feta cheese. *Food Microbiology*, 15, 215-222
- Williams A.M., Fryer J.L., Collins M.D. (1990). *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters* 68:109-114
- Wolf G., Strahl A., Meisel J., Hammes W.P. (1991) Heme-dependent catalase activity of lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*, 12:133-40
- Yanai Y., Rosen B., Pinoky A., & Sklam D. (1977). The microbiology of pickled cheese during manufacture and maturation. *Journal of Dairy Research*, 44: 149-153
- Yun J.J., Barbano D.M., Kindstedt P.S., & Larose K.L. (1995). Mozzarella cheese. Impact of whey pH at draining on chemical composition, proteolysis, and functional properties. *Journal of Dairy Science*, 78: 1-7
- Γιαννούλη Ε. (2005). Το γάλα και τα προϊόντα του: μια αρχαιολογική διαδρομή. *Πρακτικά 1^{ου} Τριμήνου Εργασίας Η Ιστορία του Ελληνικού Γάλακτος και των Προϊόντων του* (σελ. 2). Ξάνθη, 7-9 Οκτωβρίου 2005

- «Ελληνικά Τυριά Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης».(2007). Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Διεύθυνση Βιολογικής Γεωργίας, Τμήμα ΠΟΠ - ΠΓΕ – ΕΠΠΕ
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 853/2004 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 29ης Απριλίου 2004 για τον καθορισμό ειδικών κανόνων υγιεινής για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης
- ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 2073/2005 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 15ης Νοεμβρίου 2005 περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα
- Κ.Τ.Π. (2009). Κώδικας Τροφίμων και Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης. Αθήνα: Εθνικό Τυπογραφείο
- Λιτοπούλου-Τζανετάκη Ε. (1989). «Μικροβιολογία γάλακτος». Α.Π.Θ. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων.
- Μάντης Α. (2000): Υγιεινή και Τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του. (Εκδόσεις Κυριακίδη).
- Ρουσσίδης και Τζανετάκης, 2005. Χαρακτηριστικά και ιδιότητες επιφανειακής μικροχλωρίδας από διάφορα είδη σκληρών τυριών (Μεταπτυχιακή Διατριβή)